



# Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation de la réponse des cardiomyocytes au stress RE et à l'apoptose

Alexandre Prola

## ► To cite this version:

Alexandre Prola. Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation de la réponse des cardiomyocytes au stress RE et à l'apoptose. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114815 . tel-01252730

**HAL Id: tel-01252730**

**<https://theses.hal.science/tel-01252730>**

Submitted on 8 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

## DISCIPLINE :

*PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

ANNÉE 2013-2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1280

## THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 30/06/2014

Par

**Alexandre PROLA**

# Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation de la réponse des cardiomyocytes au stress RE et à l'apoptose

**Directeur de thèse :**  
**Co-directeur de thèse :**

Dr Christophe LEMAIRE  
Dr Renée VENTURA-CLAPIER

### Composition du jury :

*Président du jury :*  
*Rapporteurs :*

Pr Christian Poüs  
Dr Mathias Mericksay  
Pr Michel Ovize  
Dr Hervé Sanchez  
Dr Éric Chevet

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

*Examineurs :*



## Résumé

Des altérations de fonctions physiologiques du réticulum endoplasmique (RE) induisent un processus appelé stress RE. Dans le domaine cardiovasculaire, plusieurs travaux ont montré que le stress RE contribue au développement de la majorité des pathologies cardiaques. En réponse au stress RE, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) est activée afin de restaurer l'homéostasie du RE et de permettre la survie de la cellule. Néanmoins, dans le cas d'un stress RE excessif ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la cellule est éliminée par apoptose contribuant au développement de la pathologie cardiaque. Une thérapie prometteuse pour lutter contre ce type de pathologie consisterait donc à moduler la réponse au stress RE afin d'inhiber l'apoptose des cardiomyocytes. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux modifications induites en réponse au stress RE dans le cœur et au rôle de la sirtuine 1 (SIRT1) dans la modulation de cette réponse. SIRT1 est une déacétylase activée par différents stress cardiaques et connue pour favoriser la survie cellulaire. D'une part, j'ai mis en évidence que le stress RE induit une modification importante de l'architecture des cardiomyocytes et en particulier une augmentation des contacts RE/mitochondries associée à une altération de la fonction mitochondriale. D'autre part, en utilisant une lignée cellulaire (H9c2), des cardiomyocytes de rat adulte et des souris invalidées pour SIRT1, j'ai démontré *in vitro* et *in vivo* (i) que SIRT1 est activée et joue un rôle cardioprotecteur en réponse au stress RE, (ii) que SIRT1 limite la réponse UPR en régulant spécifiquement la voie PERK, et (iii) que SIRT1 régule la voie PERK en déacétylant le facteur d'initiation de la traduction, eIF2 $\alpha$ , sur deux résidus lysine. Ces résultats montrent donc pour la première fois que SIRT1 est impliquée dans la régulation de la réponse apoptotique au stress RE des cardiomyocytes et suggèrent que cette déacétylase serait une cible thérapeutique intéressante pour prévenir l'apoptose dans les pathologies cardiaques liées au stress RE.

## Abstract

Impairment of physiological functions of the endoplasmic reticulum (ER) induces the so-called ER stress. ER stress has been implicated in many cardiovascular diseases including ischemic heart, hypertrophy and heart failure. To overcome the deleterious effect of ER stress, an evolutionarily conserved adaptive response known as Unfolded Protein Response (UPR) is activated in order to restore ER homeostasis and promote cell survival. Nevertheless, in the case of prolonged or severe ER stress, apoptotic cell death is ultimately activated to eliminate stressed cells, thus contributing to the development of the pathology. The modulation of ER stress response, in order to reduce cardiomyocyte apoptosis, thus appears as a promising therapeutic strategy for such pathologies. During my Ph.D thesis, I studied the modification that occur during ER stress response in the heart and the role of the sirtuine 1 (SIRT1) in the modulation of this response. SIRT1 is a deacetylase activated in response to many cardiac stresses to promote cell survival. First, we showed that ER stress induces important structural modifications of cardiomyocytes and in particular an increase in contact sites between ER and mitochondria associated with an alteration of the mitochondrial function. Secondly, using a cell line (H9c2), freshly isolated adult rat ventricular cardiomyocytes and SIRT1-KO mice, we demonstrated *in vitro* and *in vivo* (i) that SIRT1 is activated and plays a cardioprotective role in ER stress response, (ii) that SIRT1 attenuates the UPR by specifically regulating the PERK pathway, and (iii) that SIRT1 modulates PERK axis by deacetylating the translation initiation factor, eIF2 $\alpha$ , on two lysine residues. Collectively, our results provide the first evidence that SIRT1 modulates ER stress-induced apoptosis in the heart and suggest that this deacetylase may represent a therapeutic target to prevent apoptosis in cardiac pathologies associated to ER stress.





# **REMERCIEMENTS**

Pour commencer, je remercie les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux : tout d'abord je remercie Christian Pouïs d'avoir accepté de présider ce jury. Un grand merci également à Hervé Sanchez et Éric Chevet, examinateurs de mon travail et à Michel Ovize et Mathias Mericskay, rapporteurs de ma thèse.

Je remercie Rodolphe Fischmeister de m'avoir accueilli au sein de l'U769 en tant que doctorant : ton laboratoire est un lieu idéal pour réaliser une thèse. J'ai grandement apprécié ta disponibilité ; ton avis et tes conseils au sujet de mon projet scientifique ou de ma carrière professionnelle ont été précieux. Merci également d'avoir fait en sorte que ma thèse se termine dans de bonnes conditions.

Je suis reconnaissant à Renée Ventura-Clapier et Anne Garnier-Fagart les co-directrices de l'équipe au sein de laquelle j'ai mené mes travaux. Merci à toi Renée pour m'avoir accepté comme étudiant en thèse sous ta direction, m'avoir fait confiance et pour avoir rendu possible ces belles années de recherche. Même si mon projet m'a un peu écarté de la mitochondrie, j'ai conscience de la chance que j'ai eue de bénéficier de ton expertise dans ce domaine. Un grand merci à toi Anne, pour ton expertise en biologie moléculaire et pour ton immense aide dans la gestion de l'élevage des souris. Ta patience et ta bonne humeur ont rendu agréable cette partie contraignante de mon travail.

Je remercie bien évidemment et très sincèrement Christophe Lemaire qui a assuré l'essentiel de l'encadrement de ma thèse. A ton contact j'ai énormément appris, techniquement mais également dans la manière d'appréhender et résoudre les problèmes ou encore de présenter mes résultats. Ton exigence dans le domaine de la rédaction m'a parfois fait un peu souffrir, mais au final m'a fait beaucoup progresser. En plus de tout ce que tu m'as appris, tu m'as aussi donné beaucoup de libertés, dans l'organisation de mon travail et dans l'orientation de mon projet de recherche, ce qui m'a permis de vraiment profiter de mes années de thèse. Je suis conscient de la chance que j'ai eue de bénéficier d'une si bonne formation, je t'en suis très reconnaissant et t'en remercie chaleureusement.

A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai travaillé dur pour réussir à obtenir les fameuses valeurs correctes de respiration établies par Vladimir Veksler. Ce fut une chance pour moi que de pouvoir bénéficier des conseils de l'un des créateurs de cette technique ; j'ai beaucoup appris durant cette période, merci. J'ai également beaucoup apprécié les nombreuses discussions autour de cette technique avec Jérôme Piquereau. Je te félicite pour ton poste de maître de conférences et te souhaite beaucoup de réussite dans tes futurs projets.

L'arrivée d'Arnaud dans notre équipe m'a beaucoup apporté. Ton aide quotidienne pour les expériences *in vivo*, la gestion de l'élevage, les comptages de cardiomyocytes, les commandes de produits, et j'en passe, s'est révélée précieuse. Je n'oublie pas nos nombreuses discussions scientifiques qui m'ont fait beaucoup avancer. Merci pour tout, bonne chance pour la suite et à bientôt au line up !

Tout au long de ma thèse j'ai pu bénéficier de la plate-forme Transprot pour mes travaux de transcriptomique et de protéomique. Les échanges avec les deux responsables Céline Boursier et Claudine Deloménie ont toujours été très formateurs et agréables : soyez en chaleureusement remerciées. Une pensée particulière pour Céline que mon projet a parfois contrainte à rester tard le soir, merci pour ton investissement et ta motivation. De par mes travaux sur la souris, j'ai passé beaucoup de temps à l'animalerie. Je souhaite donc remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie et plus particulièrement Valérie Domergue et Pauline Robert dont la disponibilité et la rigueur ont été une aide précieuse.

Ma rencontre avec plusieurs membres de l'unité Inserm U1014 a considérablement enrichi mes travaux, je souhaite donc remercier Hélène François et son étudiante Lola Lecru

pour les expériences d'histochimie, ce fut une collaboration fructueuse. J'ai également eu la chance de rencontrer Pierre Eid dont l'expertise en biochimie a permis à mes travaux de prendre une autre dimension. Ta disponibilité, ton enthousiasme scientifique et tous les tours que tu as dans ton sac ont fait des jours que j'ai passés à travailler avec toi des moments très formateurs et très agréables. Pour tout ça je te remercie.

Grâce à mes directeurs de thèse, j'ai également eu la chance de participer à plusieurs collaborations qui ont toujours été assorties d'échanges scientifiques d'un grand intérêt : je remercie pour cela Mathias Mericskay et son étudiant Youssef Mallat, Santos Susin et son étudiant Mathieu Baritaud ainsi que Serge Luquet. Je remercie également Fanny Caffin : après avoir travaillé ensemble pendant ta thèse, ce fut un plaisir de te retrouver dans le cadre d'une collaboration entre notre équipe et ton laboratoire de post-doc.

L'aide de Florence pour les dissociations de cardiomyocytes, de Philippe pour les échocardiographies et de Mélanie pour les WB, PCR et dosages enzymatiques m'ont grandement avancé : un grand merci à vous trois. Je remercie Audrey, pour ses conseils techniques et Eric, qui sait si bien s'occuper de mes bactéries ! J'avais eu vent de l'efficacité de la secrétaire de l'U769 avant de commencer ma thèse : sa réputation est méritée. Merci Françoise pour ton sens de l'organisation, ta réactivité et ta patience. Merci pour ton aide, ta compréhension et ton soutien lors de mes (nombreux) déboires administratifs. Je tiens à remercier tous les autres membres de l'U769 du 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> étage. La liste est trop longue pour vous citer tous, mais vous êtes nombreux à avoir contribué, de près ou de loin, à faire de ma thèse une période heureuse de ma vie.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir participer à l'encadrement de plusieurs étudiants. Cet aspect de mon travail s'est révélé très enrichissant et je tiens pour cela à remercier nos collaboratrices tunisiennes Amal, Inthidar et Manel ainsi que Lauriane pour son court passage dans notre équipe. Je tiens à remercier plus particulièrement Julie qui, je l'espère, prendra la suite de mes travaux : ton implication, ta rigueur et ta gentillesse ont fait de ton stage une expérience instructive et plaisante.

Durant ma 2<sup>ème</sup> année de thèse, ma mission de vulgarisation scientifique m'a amené à travailler au sein de la maison des sciences de Chatenay-Malabry. Pour tous les très bons moments que j'ai passés avec vous, je remercie chaleureusement Fabrice, Mathilde, Aude, Joëlle et Pierre.

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de mon parcours scientifiques et qui ont contribué à développer ma passion pour la recherche, je pense notamment à Hervé Dubouchaud et Valérie Chaté du LBFA, Xavier Bigard et Julia Tonini de l'IRBA. Une pensée particulière pour Hervé Sanchez et Alexandra Malgoyre, mes deux encadrants de Master 2. Votre investissement dans mon encadrement, la formation que j'ai acquise grâce à vous et votre bonne humeur ont joué un rôle important dans ma vie de scientifique. Pour ça et pour votre soutien dans la période délicate de recherche de financement de thèse, je vous remercie vivement. Je n'oublie pas Clovis, mon partenaire lors des longues journées de respiration de mon stage de master 2, devenu, au fil des manips, un ami. Tu as beaucoup contribué à l'excellente ambiance de ce stage, je te souhaite beaucoup de réussite dans ta thèse et dans tes futurs projets.

Merci à mes amis qui ont tous beaucoup entendu parler de ma thèse pendant ces dernières années, je pense à Damien (vendeur de caxirola), à Ossama (qui a donné son nom à un rond-point), à Angélique (la globe trotteuse), à Michel (qui pratique les jeux de mots à haut niveau) et à Hervé (plus d'une fois retrouvé inanimé en fin de soirée, assomé par nos discussions de labo). Je remercie également Martine (dont j'apprécie le travail tous les jours) et Solène (la spécialiste des fourreaux d'épées). Les entraînements de saut à la perche m'ont beaucoup aidé à décompresser dans les moments de stress, je tiens donc à remercier l'ensemble des perchistes d'Antony et plus particulièrement Yann pour la super ambiance que

tu sais instaurer, Hadrien pour nos discussions scientifico-philosophiques et Sabine pour ses trop rares muffins (oui, il y a un message !).

Enfin, je remercie ma famille que j'ai laissée à Grenoble pour mener cette thèse, et en particulier mes parents et mon frère, qui ont toujours cru en moi et qui se sont intéressés semaine après semaine à l'avancée de mes recherches. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Une pensée spéciale pour mon père qui m'a toujours soutenu et m'a toujours encouragé à donner le meilleur de moi-même. Je te dédie cette thèse.

Au cours des trois dernières années, j'ai beaucoup cherché, mais j'ai aussi fait la plus belle des découvertes. Ma dernière pensée sera pour toi Cindy, merci pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour.



## Liste des publications

1. Caffin F, **Prola A**, Piquereau J, Novotova M, David DJ, Garnier A, Fortin D, Alavi M, Veksler V, Ventura-Clapier R, Joubert F.  
*Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice.*  
J Physiol. (2013) 1;591(Pt 23):6017-37
2. Gallerne C, **Prola A**, Lemaire C.  
*Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2.*  
Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res (2013) 1833(6):1356-66.
3. Piquereau J, Caffin F, Novotova M, **Prola A**, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh le H, Nicolas V, Alavi MV, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F.  
*Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload.*  
Cardiovasc Res. (2012) 94(3):408-17.
4. Joly-Amado A, Denis RG, Castel J, Lacombe A, Cansell C, Rouch C, Kassis N, Dairou J, Cani PD, Ventura-Clapier R, **Prola A**, Flamment M, Fougelle F, Magnan C, Luquet S.  
*Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning.*  
EMBO J. (2012) 31(22):4276-88
5. Diguët N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, **Prola A**, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M  
*Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy.*  
J Biol Chem. (2011) 286(40):35007-19.

### **Publication en préparation :**

**Prola A**, Guilbert A, Pires Da Silva J, Lecru L, Piquereau J, Mateo P, Lefebvre F, Fortin D, Gressette M, Boursier C, Gallerne C, François H, Garnier A, Eid P, Ventura-Clapier R and Lemaire C  
*SIRT1 regulates endoplasmic reticulum stress through deacetylation of eIF2 $\alpha$*



# Table des matières

<b>AVANT PROPOS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I : FONCTION CONTRACTILE ET ENERGETIQUE CARDIAQUE .....</b>	<b>21</b>
I. <i>Le cœur, moteur de notre circulation sanguine .....</i>	<i>21</i>
A. Anatomie et fonction du cœur .....	21
B. Le cardiomyocyte, une cellule musculaire particulière .....	22
C. La contraction du cardiomyocyte .....	23
1. Spécificité du déclenchement de la contraction du cardiomyocyte .....	23
2. Les sarcomères .....	24
3. Contraction et consommation énergétique du cardiomyocyte .....	26
II. <i>La bioénergétique du cardiomyocyte .....</i>	<i>27</i>
A. Les substrats énergétiques du cardiomyocyte .....	27
B. La mitochondrie .....	28
1. Origine et structure des mitochondries .....	28
2. La dynamique mitochondriale .....	30
3. La biogénèse mitochondriale .....	31
4. La phosphorylation oxydative .....	33
5. Les systèmes de transferts énergétiques .....	36
a. La canalisation directe .....	36
b. La navette des créatines kinases .....	36
c. La navette des adénylate kinases .....	38
6. Les autres rôles de la mitochondrie .....	38
<b>CHAPITRE II : PATHOLOGIE CARDIAQUE ET THERAPIES ACTUELLES .....</b>	<b>39</b>
I. <i>L'insuffisance cardiaque .....</i>	<i>39</i>
II. <i>Les thérapies actuelles de l'insuffisance cardiaque .....</i>	<i>40</i>
<b>CHAPITRE III : FONCTIONS DU RE, STRESS RE ET PATHOLOGIES CARDIAQUES .....</b>	<b>42</b>
I. <i>Existe-t-il plusieurs compartiments réticulaires dans le cœur ? .....</i>	<i>42</i>
II. <i>Les fonctions physiologiques du RE .....</i>	<i>45</i>
A. La synthèse des protéines .....	45
1. Initiation de la traduction .....	45
2. Elongation .....	47
3. Terminaison .....	48
B. Le repliement des protéines .....	49
III. <i>Le stress du réticulum endoplasmique .....</i>	<i>53</i>
A. La réponse au stress du réticulum endoplasmique .....	53
1. Régulation de la branche ATF6 de la réponse UPR .....	55
2. Régulation de la branche IRE1 de la réponse UPR .....	55
3. Régulation de la branche PERK de la réponse UPR .....	56
4. Relations entre les différentes branches de la voie UPR .....	57
B. Mort cellulaire et apoptose dans le cœur .....	58
1. Les caspases .....	60
2. La famille Bcl-2 .....	61
3. La voie mitochondriale de l'apoptose .....	62
C. Stress RE, réponse UPR et apoptose .....	67
1. Branche PERK et apoptose .....	68
2. Branche IRE1 et apoptose .....	68
3. Branche ATF6 et apoptose .....	68
4. Caspase 12 et apoptose .....	69
5. Calcium, pore de transition de perméabilité mitochondriale et apoptose .....	69
IV. <i>Le stress RE dans les pathologies cardiaques .....</i>	<i>71</i>
A. Stress RE délétère et pathologies cardiaques .....	72
B. Stress RE bénéfique et pathologies cardiaques .....	75
<b>CHAPITRE IV : SIRTUINE 1 .....</b>	<b>77</b>
I. <i>La famille des sirtuines .....</i>	<i>77</i>
A. Historique .....	77
B. Les différents isoformes de la famille des sirtuines .....	77
C. Activité de la sirtuine 1 .....	78
II. <i>Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1 .....</i>	<i>80</i>
A. Régulation de l'expression de SIRT1 .....	80



1. Régulation de la transcription de SIRT1 .....	80
2. Régulation de la stabilité de l'ARNm de SIRT1 .....	82
3. Régulation de la stabilité de la protéine SIRT1 .....	83
B. Régulation de l'activité de SIRT1 .....	83
1. Régulation de l'activité de SIRT1 par la disponibilité en NAD <sup>+</sup> .....	83
2. Régulation de l'activité de SIRT1 par modification post-traductionnelle .....	84
a. Régulation par phosphorylation .....	84
b. Régulation par nitrosylation, méthylation et sumoylation .....	85
3. Régulation de l'activité de SIRT1 par interactions avec d'autres protéines .....	86
a. Régulation par DBC1 .....	86
b. Régulation par AROS .....	87
III. Les cibles de SIRT1 .....	87
A. SIRT1 et le métabolisme énergétique .....	88
B. SIRT1 et les défenses anti-oxydantes .....	89
C. SIRT1 et l'apoptose .....	89
D. SIRT1 et l'hypoxie .....	90
E. SIRT1 et la réponse au choc thermique .....	90
F. SIRT1 et l'inflammation .....	90
IV. Rôle de SIRT1 dans le cœur .....	91
A. Rôle de SIRT1 .....	91
B. SIRT1, une cible thérapeutique intéressante .....	92
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>95</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>97</b>
I. MATERIEL .....	99
I. Lignée cellulaire, cardiomyocytes et animaux .....	99
II. Produits chimiques et sondes fluorescentes .....	100
II. METHODES D'ETUDES CELLULAIRES .....	100
I. Culture et transfection cellulaire .....	100
A. Conditions de culture et de traitements .....	100
B. Dissociation des cardiomyocytes de rats adultes .....	100
C. Transfections siRNA .....	101
II. Cytométrie en flux .....	102
A. Analyses cytométriques .....	102
B. Mesure du taux de mortalité cellulaire .....	102
C. Mesure de la chute du $\Delta\Psi_m$ et de la nécrose .....	102
D. Mesure de l'activation de la caspase-3 .....	102
III. Microscopie .....	103
A. Microscopie à fluorescence .....	103
1. Observation de la morphologie du noyau .....	103
2. Mesure de la mortalité des cardiomyocytes .....	103
B. Microscopie électronique à transmission .....	103
IV. Dosage colorimétrique de protéines .....	103
V. Gel SDS-PAGE et immunodétection par Western Blot .....	104
VI. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative .....	105
VII. Immunoprécipitation .....	107
A. Lyse des cellules .....	107
B. Préparation des complexes billes/anticorps .....	107
C. Immunoprécipitation .....	107
VIII. Spectrométrie de masse .....	108
III. METHODES D'ETUDES POUR LE MODELE ANIMAL .....	108
I. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie .....	108
II. Microscopie électronique à transmission .....	109
III. Mesure de l'apoptose des cardiomyocytes par la méthode TUNEL .....	110
IV. Mesure des capacités oxydatives des mitochondries .....	110
A. Préparation des fibres perméabilisées .....	111
B. Mesure de la respiration mitochondriale .....	111
C. Analyse fonctionnelle des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du Km pour l'ADP .....	112
D. Analyse fonctionnelle de l'utilisation de différents types de substrats par la mitochondrie .....	112
E. Analyse des données .....	113
V. Mesure des activités enzymatiques mitochondriales et cytoplasmiques .....	113
A. Extraction des protéines .....	113
B. Mesure de l'activité du complexe IV .....	114
C. Mesure de l'activité de la citrate synthase (CS) .....	114

D. Mesure de l'activité de la Créatine Kinase totale.....	115
E. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase.....	115
F. Analyse des données de spectrophotométrie .....	115
VI. Western Blot.....	116
VII. Etudes statistiques .....	116
<b>RESULTATS .....</b>	<b>119</b>
CHAPITRE I : ETUDE ET CARACTERISATION DE LA DYSFONCTION CARDIAQUE INDUITE PAR LE STRESS RE DANS UN MODELE MURIN.....	121
CHAPITRE II. ROLE DE SIRT1 DANS LA REPONSE AU STRESS RE DES CARDIOMYOCYTES .....	143
I. Etude du rôle de SIRT1 dans la réponse apoptotique au stress RE .....	144
A. Etablissement du modèle d'étude du stress RE dans les cellules H9c2 .....	144
B. Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1 en réponse au stress RE .....	146
C. Rôle de SIRT1 dans la réponse apoptotique au stress RE délétère des cellules cardiaques .....	149
D. Caractérisation de la mort cellulaire régulée par SIRT1 en réponse au stress RE.....	151
E. Etablissement du modèle murin d'invalidation conditionnelle de SIRT1 .....	155
F. Rôle de SIRT1 dans la régulation du stress RE <i>in vivo</i> .....	158
G. Effet de l'inhibition et de l'activation de SIRT1 dans la réponse au stress RE des cardiomyocytes.....	161
II. Etude des mécanismes de régulation de la voie UPR par SIRT1 .....	162
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>175</b>
CHAPITRE I : ETUDE ET CARACTERISATION DE LA DYSFONCTION CARDIAQUE INDUITE PAR LE STRESS RE DANS UN MODELE MURIN.....	177
I. Contexte de l'étude.....	177
II. Principaux résultats obtenus.....	178
III. Discussion des résultats.....	178
A. Dysfonction mitochondriale et stress RE.....	178
B. Le stress RE responsable de la modification de l'utilisation des substrats énergétiques ? .....	179
C. Le stress RE perturbe le système transfert énergétique des créatines kinases .....	180
IV. Limites de l'étude et perspectives .....	181
CHAPITRE II : ETUDE DU ROLE DE SIRT1 DANS LA REPONSE AU STRESS RE DES CARDIOMYOCYTES .....	183
I. Contexte de l'étude.....	183
• Tout d'abord, SIRT1 est une protéine activée en réponse à de nombreux stress, dont beaucoup peuvent conduire à un stress RE tels que la restriction calorique, le stress oxydant ou encore l'hypoxie. ....	183
II. Principaux résultats obtenus.....	184
III. Discussion des résultats et perspectives .....	184
A. Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1 en réponse au stress RE .....	184
B. Rôle cardioprotecteur de SIRT1 dans l'apoptose induite par le stress RE .....	185
C. SIRT1 régule l'activation de la branche PERK en réponse au stress RE dans les cardiomyocytes.....	187
D. eIF2 $\alpha$ , une protéine clé de la réponse au stress RE dans les cardiomyocytes ? .....	188
E. SIRT1 régule l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ en réponse au stress RE .....	189
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>229</b>
ARTICLE 1 .....	231
ARTICLE 2 .....	233
ARTICLE 3 .....	235
ARTICLE 4 .....	237
ARTICLE 5 .....	239
ARTICLE 6 .....	241

## Liste des abréviations

AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ATF6	Activating Transcription Factor 6
Bcl-2	B cell lymphoma-2
BH	Bcl-2 Homology
CARD	Caspase Recruitment Domain
CED	<i>Caenorhabditis elegans</i> death gene
CHOP/GADD153	C/EBP Homologous Protein / Growth Arrest and DNA Damage inducible 153
Drp1	Dynamin related protein 1
$\Delta\Psi_m$	potentiel transmembranaire mitochondrial
EO	Espèces Activées de l'Oxygène
eIF2 $\alpha$	eukaryotic initiation Factor 2 $\alpha$
EndoG	Endonuclease G
EOR	ER-Overload Response
ERAD	ER-Associated Degradation
ERSE	ER Stress Response Element
Fis1	Fission protein 1
FLIP	FLICE-like Inhibitory Protein
Grp78/BiP	Glucose Related Protein 78 / Binding immunoglobulin Protein
HtrA2/Omi	High temperature requirement protein A2/ Omi stress-regulated endoprotease
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IP	Iodure de Propidium
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase
Mfn2	Mitofusine 2

MMP	mitochondrial membrane permeabilization
MPT	mitochondrial permeability transition
mi-CK	mitochondrial Creatine Kinase
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PERK	PKR-like ER protein Kinase
PMM	Perméabilisation des Membranes Mitochondriales
PTP	Pore de Transition de Permabilité
RE	Réticulum Endoplasmique
RS	Réticulum Sarcoplasmique
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding protein with Low pI
tBid	truncated Bid
TG	Thapsigargine
TN	Tunicamycine
TNF-R	TNF-Receptor
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
UPR	Unfolded Protein Response
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
XBP1	X-box Binding Protein 1



## Avant propos

L'insuffisance cardiaque (IC) est la première cause de mortalité dans le monde et deux millions de nouveaux cas sont décelés chaque année. D'après un rapport de l'OMS datant de 2009, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 17,1 millions de décès par an dans le monde. En 2006, elles représentaient 28% des décès en France dont 23% seraient liés à l'insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique complexe et multifactoriel caractérisé par une incapacité du cœur à maintenir un débit sanguin suffisant aux besoins de l'organisme. En dépit d'importants efforts produits par la recherche sur les pathologies cardiaques, la mortalité et les coûts sociaux économiques liés à ce syndrome restent malgré tout élevés. Il apparaît donc important de trouver de nouvelles stratégies médicamenteuses de l'insuffisance cardiaque plus ciblées, dont l'objectif serait de préserver directement la fonction myocardique. Le développement de la pathologie cardiaque, et plus particulièrement la transition du stade où des adaptations bénéfiques telle que l'hypertrophie permettent le maintien du débit cardiaque, vers un stade où ces adaptations deviennent délétères et contribuent aux altérations de la fonction cardiaque est encore mal comprise. De nombreuses études sont ainsi menées avec pour objectif de mieux comprendre le développement de la pathologie et d'identifier de nouvelles voies de signalisations associées. En particulier, les voies de signalisations impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (stress RE) ont récemment fait l'objet d'étude dans le domaine cardiaque et représentent un domaine de recherche prometteur.

Sous le terme stress RE, on regroupe l'ensemble des signaux induisant une altération des fonctions de cet organe. En réponse au stress RE, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et des mécanismes compensatoires sont déclenchés dans le but de restaurer l'homéostasie du RE et de permettre la survie de la cellule. Néanmoins, dans le cas d'un stress RE excessif ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la cellule est éliminée par apoptose. Depuis plus de 20 ans, le stress RE et la réponse UPR ont été associés à plusieurs pathologies telles que le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives ou encore le cancer (pour revue voir Hetz, Chevet et al. (2013)). Dans le domaine cardiovasculaire, même si les études sur le rôle du stress RE sont très récentes (2004), de nombreux travaux ont montré que le stress RE contribue au développement de la majorité des pathologies cardiaques (pour revue voir (Minamino and Kitakaze 2010)). L'objectif actuel des recherches sur le stress RE en physiopathologie cardiaque a pour but non pas d'inhiber le

stress RE et la réponse UPR, mais plutôt de les moduler, de manière à conserver les réponses adaptatives bénéfiques tout en limitant la survenue de l'apoptose délétère.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de la sirtuine 1 (SIRT1), le membre fondateur de la famille des sirtuines. La sirtuine 1 est une déacétylase dépendante du  $\text{NAD}^+$  et impliquée dans l'homéostasie énergétique. Cette protéine est devenue la cible de nombreux projets de recherche suite à une publication montrant chez la levure que les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité sont dépendants de Sir2 $\alpha$ , l'homologue de SIRT1 ((Lin, Defossez et al. 2000)). Depuis, de nombreuses recherches ont été menées et SIRT1 est aujourd'hui considérée comme une protéine de réponse au stress permettant de rétablir l'homéostasie cellulaire.

Dans ce contexte, les travaux de recherche que j'ai menés au cours de ma thèse ont eu pour but :

- d'étudier *in vivo* les modifications associées au stress RE dans le cœur, afin de mieux comprendre le rôle du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques.
- d'étudier le rôle de SIRT1 dans la régulation de l'apoptose induite en réponse au stress RE délétère dans les cardiomyocytes.

**Introduction**

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

***Annexes***









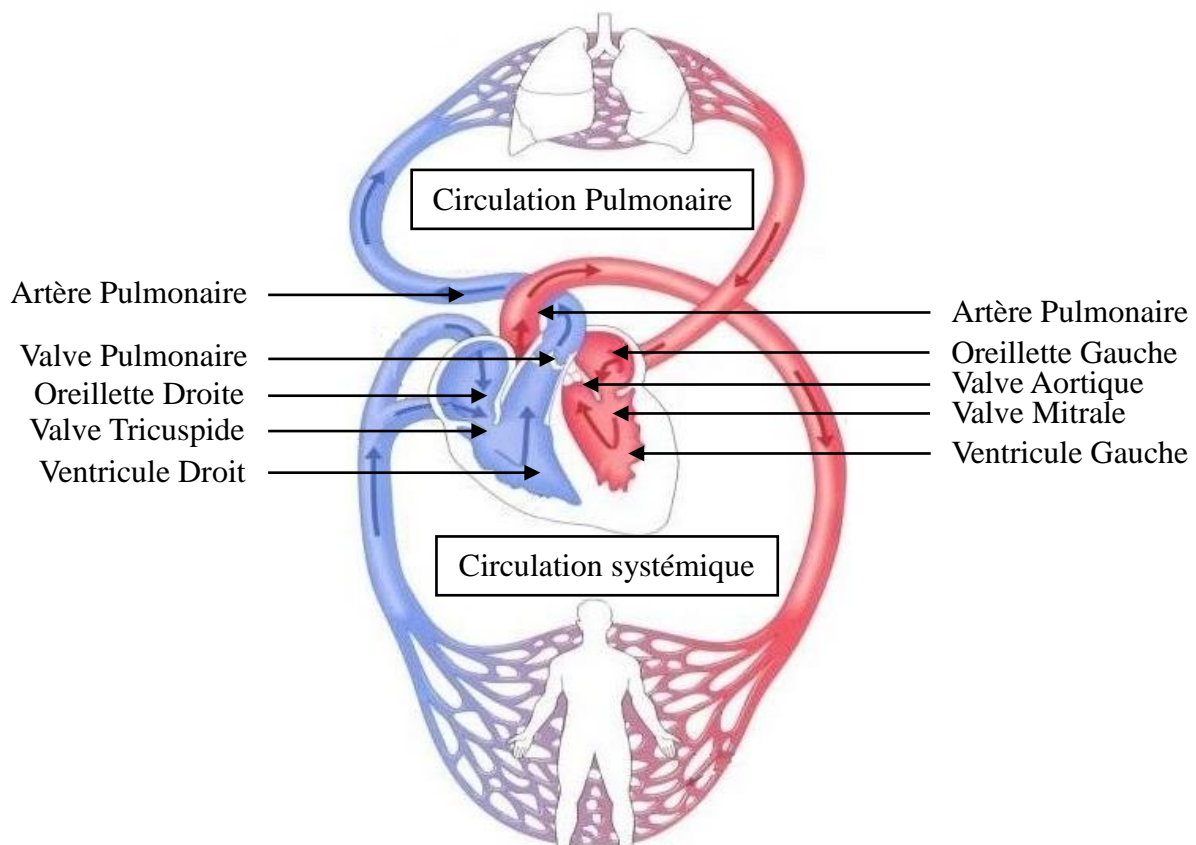
## **Chapitre I : Fonction contractile et énergétique cardiaque**

### **I. Le cœur, moteur de notre circulation sanguine**

#### **A. Anatomie et fonction du cœur**

Le cœur est un muscle creux séparé en deux, le cœur gauche et le cœur droit, par les septums interauriculaires et interventriculaires. Chaque cœur est composé d'une cavité supérieure, l'oreillette, et d'une cavité inférieure, le ventricule. Des valves situées entre l'oreillette et le ventricule (appelée valve tricuspide pour le cœur droit et valve mitrale pour le cœur gauche), ainsi que des valves à la jonction des ventricules et des artères permettent d'orienter la circulation du sang dans un sens : des oreillettes vers les ventricules puis des ventricules vers les artères. Le cœur peut être considéré comme une pompe qui en se contractant va éjecter du sang dans les vaisseaux et ainsi permettre la circulation sanguine. Cette organisation bilatérale a comme intérêt de créer deux circulations sanguines séparées. La « petite circulation » ou « circulation pulmonaire », du cœur droit vers le cœur gauche en passant par les poumons, permet de réoxygéner le sang et de le décharger en dioxyde de carbone. La « grande circulation » ou « circulation systémique », du cœur gauche vers le cœur droit, va irriguer les différents organes de l'organisme et ainsi leur apporter de l'oxygène et des nutriments (figure 1). Afin que cet apport réponde aux besoins des différents organes, la fonction contractile doit être adaptée et doit assurer une circulation du sang suffisante. Cette fonction cardiaque est assurée par le remplissage des cavités cardiaques au cours de la relaxation (diastole) et l'éjection du sang vers la circulation lors de la contraction (systole). Lors de la diastole, les valves auriculo-ventriculaires tricuspide et mitrale s'ouvrent tandis que les valves sigmoïdes se ferment. Le sang provenant du retour veineux par l'oreillette droite et de la circulation pulmonaire par l'oreillette gauche peut alors remplir les ventricules. Lors de la systole les valves auriculo-ventriculaires se ferment puis les valves sigmoïdes s'ouvrent, permettant l'éjection du sang vers l'appareil circulatoire.

Le tissu cardiaque est composé de 20 à 30% de fibroblastes, de quelques cellules nerveuses et vasculaires, mais surtout de 70% de cardiomyocytes, des cellules musculaires particulières et très spécialisées, qui de par leur activité mécanique, vont permettre la contraction du muscle cardiaque.



**Figure 1 : Anatomie cardiaque et schématisation de la circulation sanguine**

*La pompe cardiaque est divisée en deux parties distinctes : un cœur droit et un cœur gauche. Le cœur droit assure la circulation pulmonaire alors que le cœur gauche est responsable de la circulation systémique.*

## B. Le cardiomyocyte, une cellule musculaire particulière

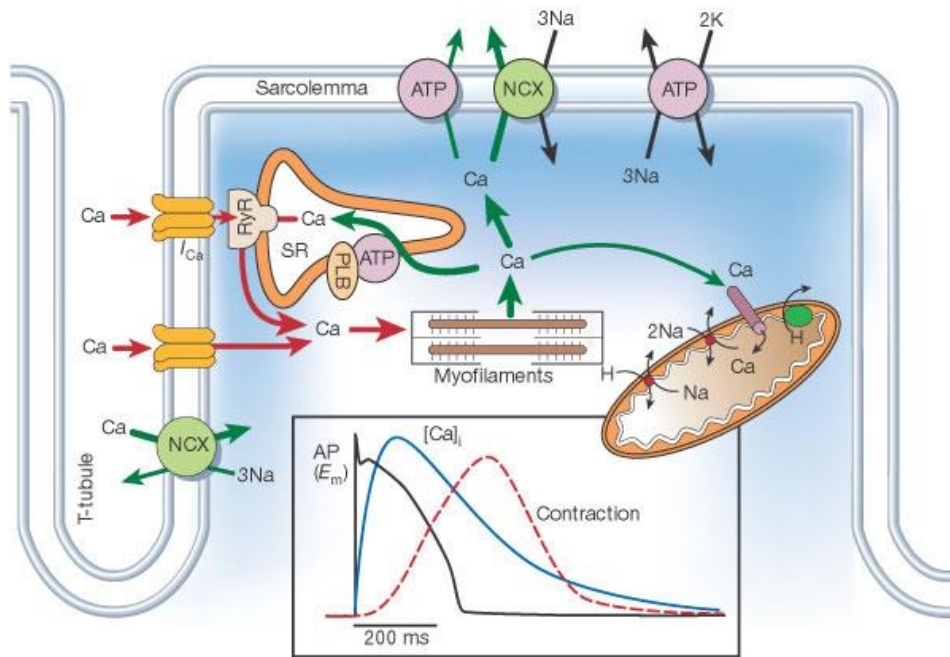
Le cardiomyocyte est une cellule musculaire striée qui se différencie des cellules musculaires squelettiques en de nombreux points. Les cellules musculaires squelettiques sont des cellules polynucléées pouvant atteindre plusieurs centimètres de long. La taille des cellules musculaires cardiaques est beaucoup plus petite puisqu'elle est d'environ  $15\mu\text{M}$  de diamètre pour  $60\mu\text{M}$  de longueur ((Braunwald 1971)). Ces cellules sont généralement uninucléées, bien qu'il soit fréquent de rencontrer des cardiomyocytes binucléés chez les rongeurs ((Leu, Ehler et al. 2001)). L'unité mécanique est obtenue par l'attachement des cellules disposées selon l'axe longitudinal par l'intermédiaire de disques intercalaires visibles en microscopie électronique sous forme de stries scalariformes (pour revue voir (Forbes and Sperelakis 1985)). Les cellules cardiaques communiquent les unes avec les autres par

l'intermédiaire de jonctions communicantes (Alcolea, Theveniau-Ruissy et al. 1999). Les cardiomyocytes présentent également de très nombreuses invaginations du sarcolemme, appelées tubules T qui vont jouer un rôle important dans le déclenchement de la contraction. Le réticulum sarcoplasmique (RS), très développé dans les cellules musculaires squelettiques, l'est beaucoup moins dans les cellules cardiaques. Enfin, le réseau mitochondrial, situé à proximité des protéines contractiles, est très développé et représente à lui seul 30% du volume d'un cardiomyocyte.

## C. La contraction du cardiomyocyte

### 1. Spécificité du déclenchement de la contraction du cardiomyocyte

Le cardiomyocyte, à la différence des cellules musculaires squelettiques, ne nécessite pas de commande nerveuse pour se contracter. En effet, au cours du développement, les premières contractions du cœur précèdent son innervation par les systèmes nerveux orthosympathiques et parasymphathiques (Smith 1970). Cet automatisme cardiaque a comme origine le nœud sinusal qui va induire des inversions transitoires de la polarisation membranaire et ainsi engendrer la contraction (pour revue, voir (Chen, Joung et al. 2010)). Ces potentiels d'action spontanés sont véhiculés le long du tissu nodal et se propagent à l'ensemble des cardiomyocytes. La propagation de ce signal électrique conduit au niveau du cardiomyocyte à un influx sodique, entraînant la dépolarisation rapide de la membrane plasmique. Cette dépolarisation induit l'ouverture de canaux calciques de type L (récepteurs à la dihydropyridine) qui permet l'entrée d'ions calciques dans le cytosol au niveau des diades formées par les tubules T et le RS. La fixation de ce calcium sur les récepteurs à la ryanodine (RyR) du RS, conduit à la libération rapide et massive du calcium contenu dans le RS (figure 2). Ce phénomène appelé « Calcium-Induced Calcium Release » (CICR) (Bers 2002) permet la mise en action de la machinerie contractile du cardiomyocyte. La conduction de la dépolarisation dans les parties les plus profondes de la cellule est assurée par les tubules T.

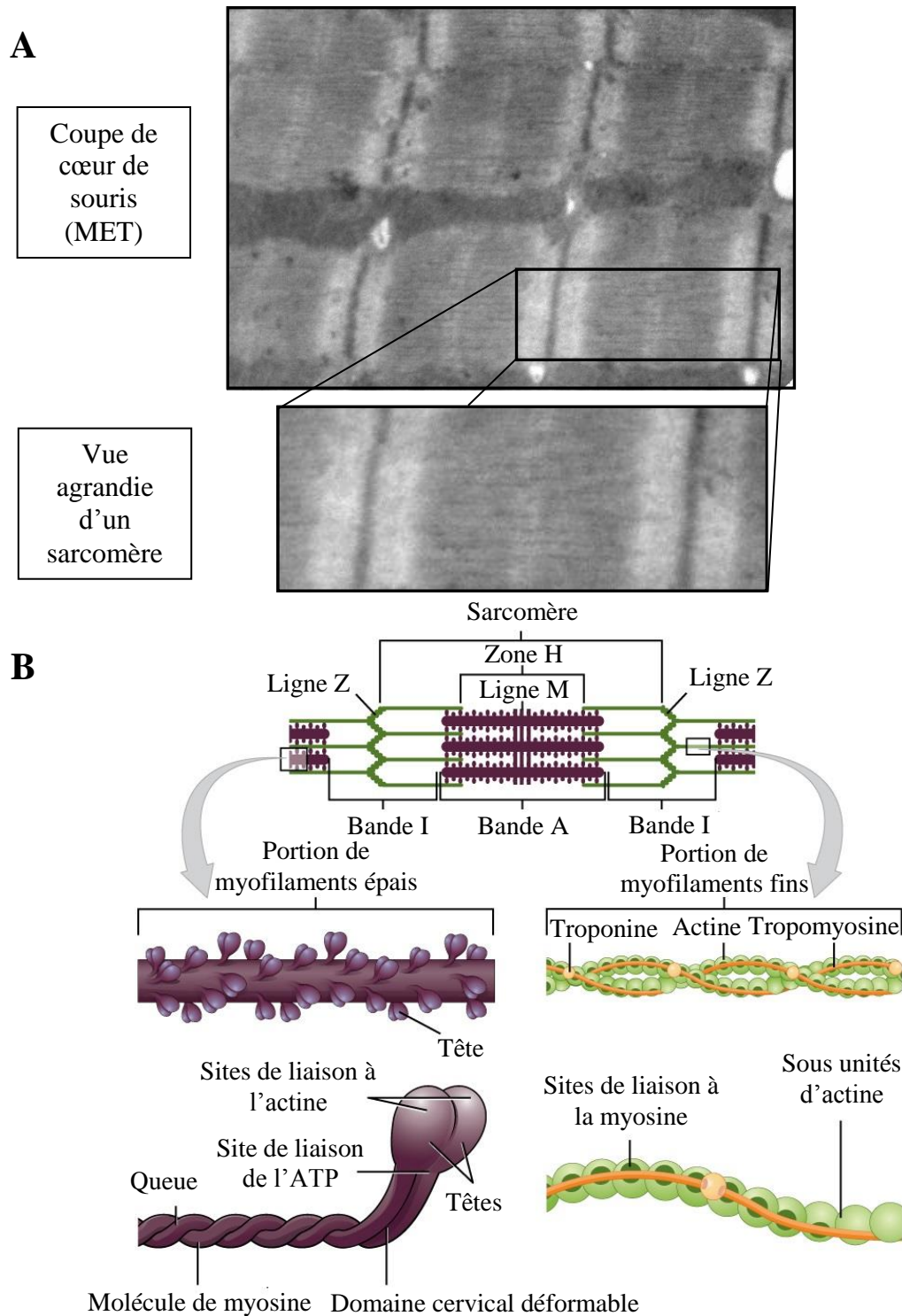


**Figure 2 : Couplage excitation-contraction (Bers 2002)**

Les potentiels d'action émis par l'oreillette droite induisent un influx sodique conduisant à la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes. Cette dépolarisation provoque l'ouverture des canaux calciques de type L et l'entrée de calcium au niveau des diades. Le calcium se fixe alors sur le récepteur à la ryanodine (RyR) provoquant ainsi la libération massive de calcium dans le cytosol et la mise en action de la machinerie contractile.

## 2. Les sarcomères

Le rôle du cardiomyocyte étant de se contracter, celui-ci est très largement équipé en matériel contractile. Les acteurs de la contraction du cardiomyocyte représentent ainsi 60% du volume cellulaire. Cette importance de la machinerie contractile est très visible sur des images de microscopie électronique où l'on peut observer un nombre important de stries transversales formées par les unités fonctionnelles de la cellule musculaire : le sarcomère (figure 3).



**Figure 3 : Ultrastructure du cardiomyocyte, sarcomère et myofilaments.**

(A) Cliché de coupe de cœur de souris obtenues par microscopie électronique et vue agrandie d'un sarcomère. (B) Représentation schématique de la composition des sarcomères. Adapté d'après Open stax CNX, Rice University (<http://cnx.org/content/m46476/latest>)

Le sarcomère est composé de myofilaments épais et de myofilaments fins. Les myofilaments épais (environ 15nm) sont constitués de molécules de myosines et également de



diverses protéines liées à la myosine. Chaque molécule de myosine est composée d'une chaîne lourde (MHC pour Myosin Heavy Chain), constituée d'une queue C-terminale et d'une tête globulaire N-terminale reliées par un domaine cervical déformable, et de deux chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) combinées à la tête globulaire. Les têtes globulaires possèdent un site de fixation aux myofilaments fins et sont pourvues d'une activité ATPasique, l'hydrolyse de l'ATP entraînant un mouvement de la tête de myosine. Les myofilaments fins sont composées en majorité de monomères d'actine qui s'associent pour former un brin filamentueux en double hélice, de dimères de tropomyosine qui entourent l'actine et contrôlent l'interaction actine/myosine et de troponine qui va constituer la partie régulatrice des myofilaments fins.

La bande A (pour anisotropique) est délimitée par les myofilaments épais et correspond à la partie sombre du sarcomère alors que la bande I (pour isotropique) apparaît en clair et n'est constituée que de myofilaments fins. Le raccourcissement du sarcomère, et par conséquent du cardiomyocyte, est caractérisée par le glissement des myofilaments épais par rapport aux myofilaments fins au sein de l'unité contractile (Huxley 1957).

### 3. Contraction et consommation énergétique du cardiomyocyte

Le glissement des myofilaments les uns par rapport aux autres nécessite l'attachement des têtes globulaires de myosine à l'actine (Pour revue voir (Mannherz and Goody 1976)). Le calcium libéré par le RS lors du phénomène de CICR se fixe sur la troponine C, ce qui induit un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine et un décalage de la troponine I qui démasque alors le site de fixation de l'actine à la myosine. L'interaction actomyosines des myofilaments combinée au mouvement spécifique de la tête de myosine entraîne le raccourcissement des sarcomères et la contraction cardiaque. L'hydrolyse de l'ATP au niveau de la tête myosine, qui permet ce changement de conformation et cette transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique, constitue la principale source de consommation énergétique du cardiomyocyte.

Pour que l'enchaînement rapide des cycles de contraction/relaxation des cardiomyocytes soit efficace, la concentration de calcium au niveau des protéines contractiles doit être finement régulée. Le RS, responsable de la libération de calcium conduisant à la contraction, est également responsable de la recapture du calcium, permettant la relaxation. Cette recapture du calcium est assurée par la protéine SERCA qui pompe le calcium contenu

dans le cytoplasme, vers la lumière du RS. Pour pomper deux ions calciques, cette ATPase consomme une molécule d'ATP, ce qui en fait la deuxième source de dépense énergétique du cardiomyocyte.

Bien que les activités de la myosine ATPase et de SERCA soient les deux principaux sites consommateurs d'énergie du cardiomyocyte, d'autres protéines utilisent de l'ATP. Par exemple, l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ou encore l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ , qui sont situés au niveau du sarcolemme et qui jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de membrane et l'homéostasie de la cellule cardiaque, consomment une quantité non négligeable d'ATP.

Le maintien de l'homéostasie de la cellule cardiaque, nécessaire à son bon fonctionnement et surtout son activité contractile font donc du cœur un organe très consommateur d'ATP. Chaque jour, le cœur se contracte 100 000 fois et pompe approximativement 10 tonnes de sang à travers l'organisme. Pour assurer une fonction myocardique suffisante, le cœur consomme environ 1mM d'ATP par seconde. Le cardiomyocyte ne disposant que de faibles réserves en ATP (8mM (Sztark, Payen et al. 1999)), la synthèse énergétique pour maintenir une concentration suffisante d'ATP est très importante afin de garantir une contraction efficace du muscle myocardique. Les systèmes de production énergétique très développés permettent au cœur de régénérer 6kg d'ATP en moyenne par jour.

## II. La bioénergétique du cardiomyocyte

### A. Les substrats énergétiques du cardiomyocyte

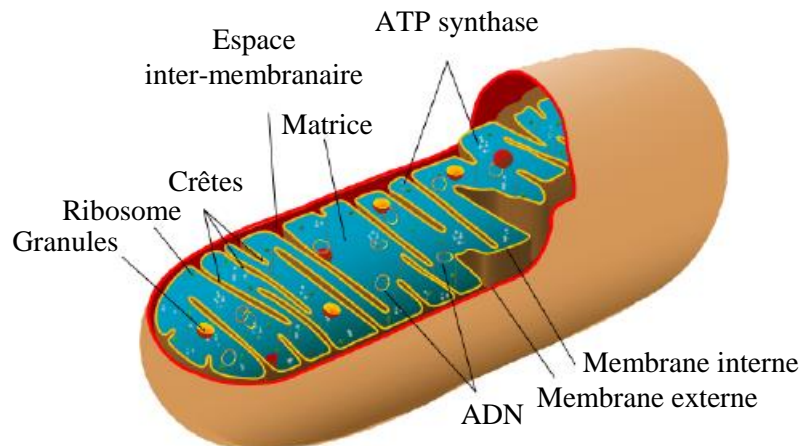
Le cœur est capable d'utiliser toutes les classes de substrats énergétiques tels que les carbohydrates, les lipides, les acides aminés et les corps cétoniques pour produire de l'ATP. Il est depuis longtemps admis que les acides gras représentent la source prédominante de substrats pour la production d'ATP dans le cœur. Toutefois, le métabolisme cardiaque est très flexible et adapte le type de substrats consommés en fonction de leur abondance respective (Taegtmeyer, Golfman et al. 2004). Par exemple, lors d'un exercice physique, l'augmentation de la lactatémie induite par l'activation des muscles squelettiques provoque l'utilisation du lactate de manière prédominante par le cœur. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration sanguine en corps cétoniques provoqués par un jeun prolongé induit une augmentation de l'utilisation de ce type de substrat. Cette flexibilité métabolique est indispensable pour maintenir une production d'ATP adéquate dans des situations physiologiques variées. Le

muscle cardiaque est un organe très oxydatif puisque sa production d'énergie dépend à 95% du métabolisme oxydatif. Ainsi, le cœur, qui ne représente que 0.4% de la masse corporelle d'un individu, est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène (Ventura-Clapier, Garnier et al. 2011). Bien qu'il y ait une production d'ATP dans le cytosol, notamment lors de la glycolyse anaérobie permettant la transformation du glucose en pyruvate (2 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée), l'essentiel de la production énergétique a lieu dans la mitochondrie (36 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée). Ces organites qui jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie représentent environ 30% du volume cellulaire du cardiomyocyte (Schaper, Meiser et al. 1985).

## **B. La mitochondrie**

### **1. Origine et structure des mitochondries**

Selon la théorie endosymbiotique (Gray, Burger et al. 2001), la mitochondrie est issue de l'intégration d'un endosymbiote procaryote par une cellule eucaryote, il y a 1,5-2 milliards d'années lorsque l'atmosphère terrestre s'est enrichi en oxygène. La mitochondrie dispose de son propre matériel génétique et contient 37 gènes dont 13 codent pour les sous unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire (pour revue voir (Calvo and Mootha 2010)). Cependant, la mitochondrie n'est pas autonome et le génome nucléaire porte l'information de la majorité des protéines mitochondriales qui sont importées dans la mitochondrie par les complexes de translocation TIM/TOM (pour revue voir (Voos, Martin et al. 1999)). Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant ainsi deux compartiments, l'espace inter membranaire et la matrice (figure 4).



**Figure 4 : Représentation schématique d'une mitochondrie**

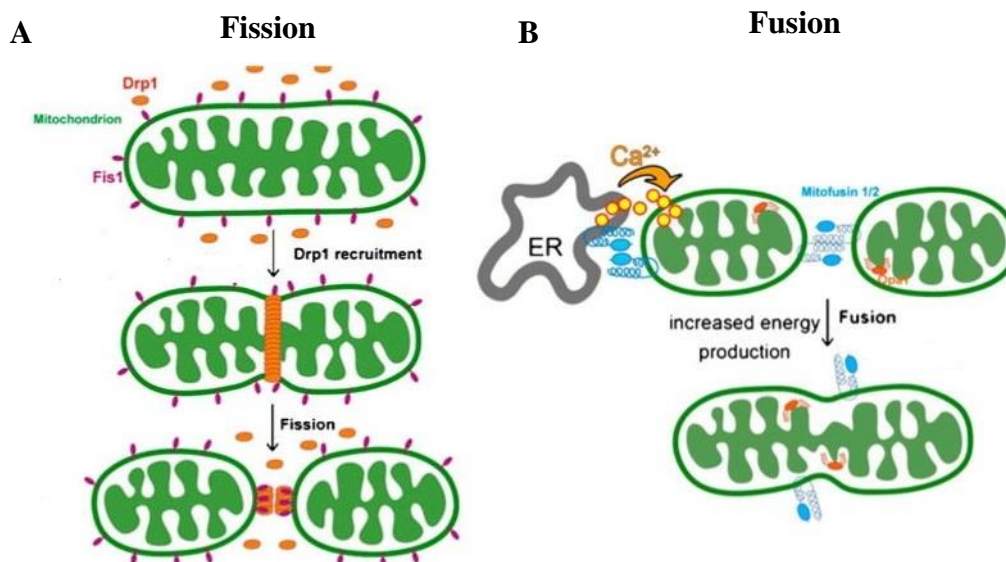
La membrane interne contient entre autres, les différents complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase responsables de la phosphorylation oxydative. La composition de cette membrane lui confère une très faible perméabilité ce qui implique la présence de nombreux transporteurs pour les échanges ioniques et de métabolites. Parmi ces transporteurs, nous pouvons citer la navette malate-aspartate permettant l'entrée du NADH cytoplasmique dans la mitochondrie et le système des carnitine palmitoyltransférases I et II (CPT-I et CPT-II) respectivement associés à la membrane externe et interne, permettant l'entrée des acides gras à chaînes longues dans la mitochondrie (Bonnefont, Djouadi et al. 2004). La membrane interne est ponctuée de nombreuses crêtes dans lesquelles sont enchâssés de manière préférentielle les complexes de la chaîne respiratoire. Dans certaines régions, les deux membranes sont en contact, ce qui permet la mise en place de structures telles que les complexes TIM/TOM ou CPTI/CPTII. Ces points de contact permettraient également la formation du pore de transition de perméabilité (PTP), un complexe multi-protéique dont l'ouverture induit le gonflement puis la rupture de la membrane externe mitochondriale. Cette rupture entraîne la libération de facteur pro-apoptotiques dans le cytoplasme tels qu'AIF et le cytochrome C et le déclenchement de l'apoptose (pour revue, voir (Javadov and Karmazyn 2007)).

Les mitochondries possèdent une certaine plasticité qui leur permet d'acquérir des formes diverses en fonction du type cellulaire (Kuznetsov and Margreiter 2009). Il est communément décrit dans la littérature que ces organites ont une dimension moyenne de 0,5-2  $\mu\text{m}$  de long pour 0,5  $\mu\text{m}$  de largeur lorsqu'ils sont isolés (Frey and Mannella 2000).

Cependant, dans une cellule, les mitochondries sont plutôt présentes sous la forme d'un réseau dynamique capable d'évoluer et de s'adapter à différentes situations physiologiques (Hom and Sheu 2009, Liesa, Palacin et al. 2009, Soubannier and McBride 2009, Jazbutyte 2010, Ong and Hausenloy 2010). L'étendue et les connexions de ce réseau sont modulées grâce à la motilité des mitochondries et à des phénomènes de fusions et fissions mitochondriales. On parle alors de dynamique mitochondriale.

## **2. La dynamique mitochondriale**

De manière générale, les réseaux mitochondriaux sont fortement interconnectés dans les cellules métaboliquement actives (Skulachev 2001), alors que des mitochondries fragmentées sont plutôt retrouvées dans les cellules quiescentes (Collins, Berridge et al. 2002). Toutefois, cette relation entre état du réseau et production d'énergie n'existe pas dans le muscle cardiaque, les cardiomyocytes, métaboliquement très actifs, présentant un réseau mitochondrial fragmenté (Kuznetsov and Margreiter 2009). Les mécanismes de fusion et fission mitochondriales sont régulés par des protéines qui favorisent la fusion comme OPA1, MFN1 et 2 (voir (Piquereau, Caffin et al. 2012, Caffin, Prola et al. 2013)) et d'autres qui favorisent au contraire la fission des mitochondries, telles que FIS1 ou DRP1 (pour revue, voir (Chan 2006, Liesa, Palacin et al. 2009)) (figure 5). L'étude des protéines de la dynamique mitochondriale a permis de démontrer que ce processus est impliqué dans la maintenance de la fonction mitochondriale par des mécanismes de restauration de mitochondries endommagées en fusionnant avec une mitochondrie intacte ou d'élimination des parties endommagées d'une mitochondrie par fission des structures altérées puis leur dégradation par mitophagie (Twig, Elorza et al. 2008, Mouli, Twig et al. 2009).



**Figure 5 : Dynamique mitochondriale : mécanismes de fusion et de fission (d'après (Frohman 2010)).** (A) Drp1 est recrutée à la membrane mitochondriale et régule le processus de fission. (B) Les mitofusines 1 et 2 régulent la fusion des membranes externes des mitochondries. OPA1 régule la fusion des membranes internes des mitochondries. MFN2 est également présent à la membrane du RE et favorise les échanges calciques entre les deux organites.

La dynamique mitochondriale serait également impliquée dans les phénomènes de prolifération (cellules de muscle lisse vasculaire, (Liesa, Palacin et al. 2009)), de mort cellulaire programmée (Martinou and Youle 2006, Sheridan, Delivani et al. 2008) et de biogénèse mitochondriale (Ventura-Clapier, Garnier et al. 2008). Les mitochondries ne pouvant pas être produites *de novo*, la biogénèse mitochondriale peut-être définie comme la croissance puis la division de mitochondries préexistantes.

### 3. La biogénèse mitochondriale

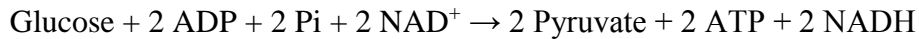
La biogénèse mitochondriale correspond au processus de formation des mitochondries et permet d'adapter les capacités de production énergétique aux besoins métaboliques de la cellule. La biogénèse mitochondriale nécessite une coordination fine entre la synthèse, l'importation et l'assemblage de protéines codées par le génome mitochondrial et par le génome nucléaire. Le génome mitochondrial contient 37 gènes codant 13 sous unités des complexes I, III, IV, et V, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomaux nécessaires pour la traduction. Le génome nucléaire code quant à lui environ 2000 protéines mitochondriales. La transcription de l'ADN mitochondrial est régulée par des facteurs nucléaires qui jouent ainsi

un rôle clé dans la biogénèse mitochondriale. Par exemple, NRF1 et NRF2 vont se lier à des promoteurs du génome nucléaire et ainsi activer la transcription de gènes codant des facteurs régulant l'expression de gènes mitochondriaux (notamment le facteur de transcription Tfam et la polymérase mitochondriale POLRMT). NRF1 et NRF2 régulent également l'expression de protéines des complexes de la chaîne respiratoire (Virbasius and Scarpulla 1994). Par ailleurs, ERR $\alpha$  contrôle entre autre l'expression de translocases permettant la translocation des protéines codées par le génome nucléaire à travers la membrane interne mitochondriale et est associé à l'induction de la biogénèse mitochondriale (Mootha, Handschin et al. 2004). Ainsi, la biogénèse mitochondriale nécessite l'activation coordonnée d'un réseau complexe de facteurs de transcription. De manière intéressante, la plupart des gènes régulant la biogénèse mitochondriale sont régulés par des co-activateurs transcriptionnels, les facteurs PGC-1 $\alpha$  et PGC-1 $\beta$ , considérés comme les chefs d'orchestre de la biogénèse mitochondriale. L'activation de PGC-1 $\alpha$  stimule ainsi la biogénèse mitochondriale et induit une augmentation de la fonction oxydative mitochondriale (Lehman, Barger et al. 2000). De plus, dans des situations physiologiques où la biogénèse mitochondriale est activée comme lors d'un exercice physique, la restriction calorique ou l'exposition au froid, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est augmentée (Puigserver, Wu et al. 1998, Akimoto, Pohnert et al. 2005, Nisoli, Tonello et al. 2005). A l'inverse, dans une situation pathologique, telle que l'insuffisance cardiaque, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est diminuée, la biogénèse mitochondriale est perturbée et la fonction mitochondriale est altérée (Garnier, Fortin et al. 2003, Zoll, Monassier et al. 2006, Garnier, Zoll et al. 2009). L'activité de PGC-1 $\alpha$  est également régulée de manière post-traductionnelle et peut être activée par phosphorylation (notamment par l'AMPK, (Jager, Handschin et al. 2007)), méthylation (par PRMT1, (Teyssier, Ma et al. 2005)) ou deacetylation (par SIRT1 (Rodgers, Lerin et al. 2005)).



#### 4. La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative permet la dégradation complète des substrats énergétiques et notamment des deux principaux utilisés par le cardiomyocyte : le glucose et les acides gras. La glycolyse anaérobie qui a lieu dans le cytoplasme, aboutit à la production de pyruvate selon la réaction :



En mode anaérobie, la glycolyse est dite incomplète et le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) selon la réaction :



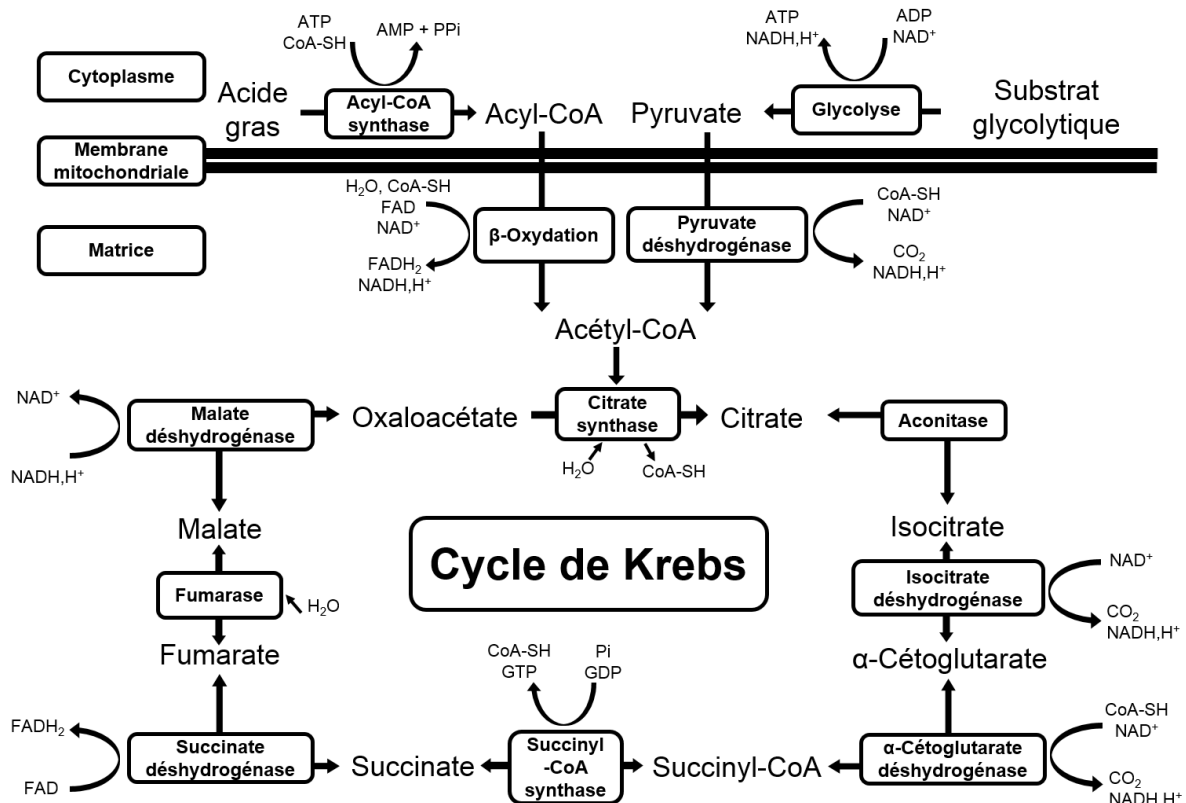
Pour son oxydation complète, le pyruvate est importé dans la mitochondrie et subit une décarboxylation par la pyruvate deshydrogénase, ce qui aboutit à la formation d'acétyl-coenzyme A.

Les acides gras sont dans un premier temps transformés en acyl-coA par l'acyl-coA synthétase dans le cytoplasme selon la réaction :



Les acyl-CoA produits sont importés dans la mitochondrie où ils vont être dégradés lors de plusieurs cycles successifs de  $\beta$ -oxydation en acétyl-coenzyme A. Chaque cycle de  $\beta$ -oxydation retire deux carbones à l'acyl-coA et permet la production d'une molécule d'acétyl-coA et des équivalents réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. L'acétyl-CoA est la molécule de convergence des deux voies métaboliques et va être dégradée par une série de réactions appelées cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (figure 6).



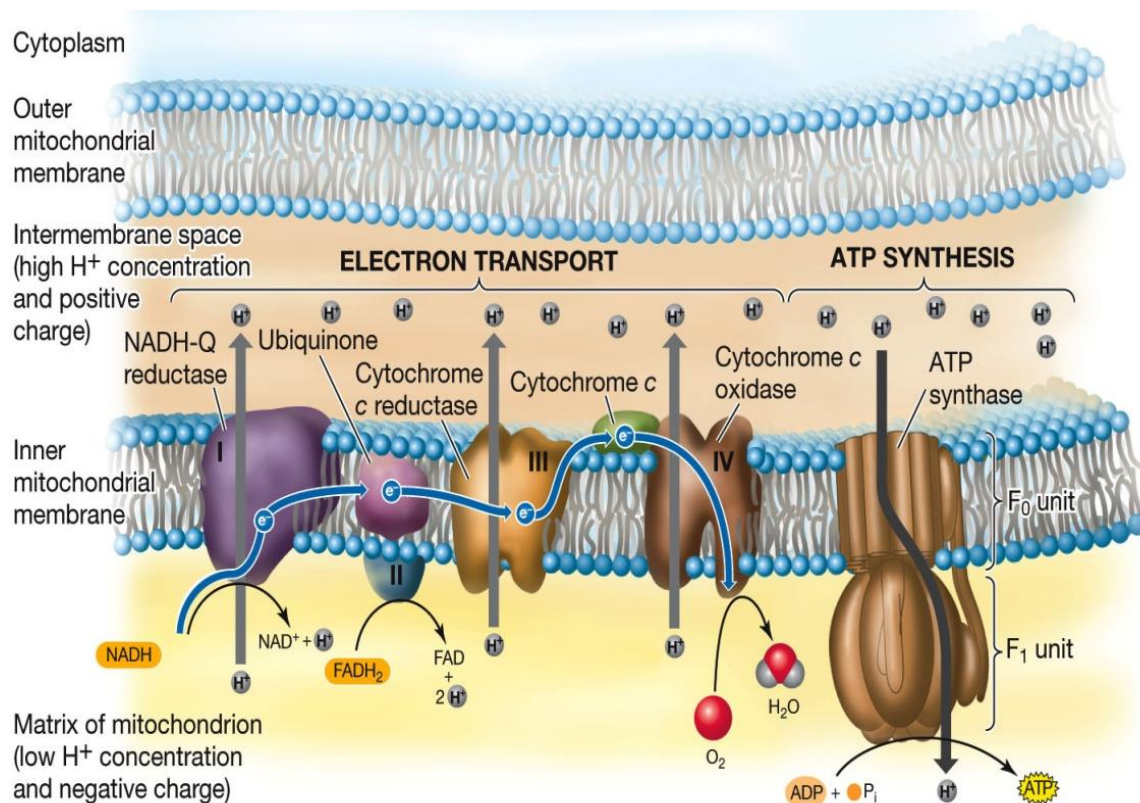


**Figure 6 : Métabolisme et cycle de Krebs**

Les acides gras sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase. Cette molécule pénètre dans la mitochondrie où elle est dégradée lors de la  $\beta$ -oxydation en acétyl-CoA, qui permet la production de  $FADH_2$  et de  $NADH$ . Les substrats de type glycolytique sont dégradés lors de la glycolyse en pyruvate, par une série de réactions associées à la production d'ATP. Le pyruvate pénètre dans la mitochondrie puis est transformé en acétyl-CoA au cours d'une réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase qui produit du  $NADH$ . L'acétyl-CoA entre alors dans le cycle de Krebs et va permettre la production d'une molécule de GTP, de 3  $NADH$  et de 1  $FADH_2$ .

La dégradation de l'acétyl-CoA est associée à la production de quatre équivalents réduits (3  $NADH$  et 1  $FADH_2$ ) qui vont être oxydés par la chaîne respiratoire (par le complexe I ou  $NADH$ -déshydrogénase pour le  $NADH$  et par le complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase pour le  $FADH_2$ ). Ces oxydations vont permettre le transfert d'électrons au sein des différents complexes de la chaîne respiratoire, de l'ubiquinone et du cytochrome C. On parle ainsi de réactions couplées d'oxydoréduction. Les électrons ont deux points d'entrée dans la chaîne respiratoire, par le complexe I ou par le complexe II et sont transférés au cours de réactions successives d'oxydoréductions à travers les différents

complexes dans l'ordre I→Q→III→Cyt C→IV ou II→Q→III→Cyt C→IV. Le complexe IV termine le transfert d'électrons par la réduction de l'O<sub>2</sub> (accepteur final des électrons) en eau suivant la réaction  $2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ . Ces réactions d'oxydoréductions sont couplées à des translocations de H<sup>+</sup> au niveau des complexes I, III et IV de la matrice vers l'espace intermembranaire. Les membranes mitochondriales étant imperméables aux ions H<sup>+</sup>, ces translocations vont générer une force protomotrice et une différence de potentiel de membrane  $\Delta\Psi_m = -220\text{ mV}$ . Les protons retournent ensuite dans la matrice en traversant le canal de l'ATP-synthase (ou complexe V), libérant une force utilisée pour phosphoryler l'ADP et ainsi produire de l'ATP :  $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$  (figure 7).



**Figure 7 : Chaîne respiratoire mitochondriale**

*L'oxydation des équivalents réduits permet l'accumulation d'ions H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire. Ce gradient de proton crée une force dite « protomotrice » qui est utilisée pour faire fonctionner l'ATP synthase et synthétiser de l'ATP (Life: the science of biology, 9<sup>ème</sup> édition, Sadava, Hillis, Heller, Berenbaum).*

## 5. Les systèmes de transferts énergétiques

La consommation importante d'ATP par le cardiomyocyte implique une synthèse d'ATP adéquate, mais aussi un transfert rapide de l'énergie produite par les mitochondries vers les sites d'utilisations (protéines contractiles, SERCA...). La diffusion simple de ces molécules ne permet pas de répondre aux exigences énergétiques du cardiomyocyte. Il existe donc des systèmes de communications entre les sites de production et d'utilisation, par l'intermédiaire de protéines kinases (Saks, Khuchua et al. 1994, Ventura-Clapier, Veksler et al. 1994) ou par une canalisation directe à l'interface des mitochondries et des ATPases (Kaasik, Kuum et al. 2010).

### a. La canalisation directe

L'architecture du cardiomyocyte et en particulier l'agencement spécifique des mitochondries, du RS et des myofilaments permet un transfert libre des nucléotides entre les mitochondries et les ATPases. L'existence de micro-domaines énergétiques permet, par ce mécanisme qualifié de canalisation directe, le maintien d'un rapport ATP/ADP élevé à proximité des ATPases, de manière à favoriser leur fonctionnement et d'un rapport ATP/ADP faible au niveau des mitochondries, afin de stimuler la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP (Kaasik, Veksler et al. 2001).

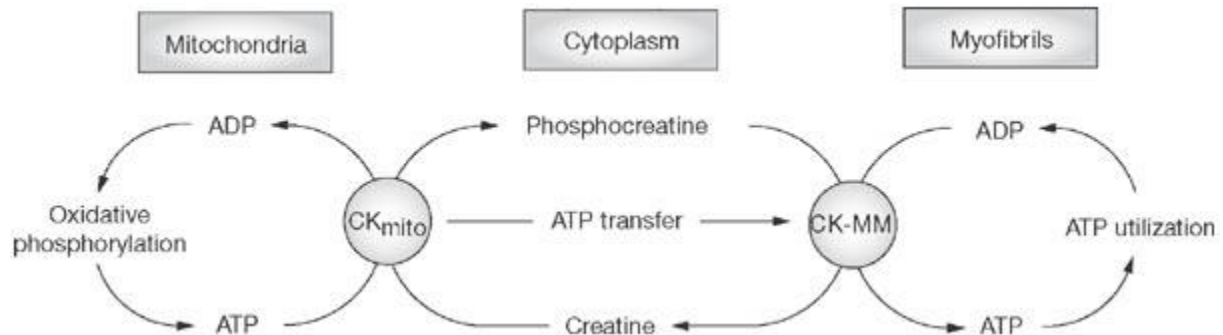
### b. La navette des créatines kinases

La créatine kinase (CK) catalyse le transfert d'une liaison phosphate riche en énergie de l'ATP vers la créatine (Cr) :

$$\text{ATP} + \text{Cr} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{PCr}$$

La phospho-créatine (PCr) ainsi produite n'est le substrat d'aucune autre enzyme et le groupement phosphate récupéré lors de cette réaction ne peut être transféré que sur l'ADP pour produire de l'ATP, on parle ainsi de « réaction cul de sac ». Bessman & Fonyo en 1966 ont cependant mit en évidence un rôle fonctionnel de cette enzyme en montrant que la créatine stimule la respiration de mitochondries isolées (Bessman and Fonyo 1966). Depuis, de nombreuses études ont permis de caractériser cette enzyme, dont il existe plusieurs isoenzymes (4 majoritaires dans le cardiomyocyte) ayant des propriétés cinétiques similaires mais des localisations intracellulaires spécifiques (pour revue, voir (Wallimann, Dolder et al. 1998)). Cette compartimentation particulière des isoformes favorisant la production de PCr au niveau des mitochondries et la production d'ATP au niveau des ATPases, permet un transfert énergétique des sites de production vers les sites de consommation. La liaison riche en énergie de la PCr produite par l'isoforme mitochondriale (la Mi-CK), est transférée grâce au

CK cytosoliques jusqu'à la MM-CK (l'isoforme cytosolique liée au sarcomère) à proximité des ATPases. Cette isoenzyme peut alors phosphoryler l'ADP produit localement pour produire de l'ATP et ainsi conserver un fonctionnement correct des ATPases. Ce système agit également comme un rétrocontrôle de la fonction mitochondriale, en favorisant un rapport ATP/ADP faible à proximité de la mitochondrie, de manière à stimuler la phosphorylation oxydative et la production d'ATP lors d'une activation importante des ATPases (figure 8).



**Figure 8 : Schéma du système des transferts énergétiques des créatines kinases**

Les créatines kinases assurent le transfert d'une liaison phosphate des sites producteurs (les mitochondries) jusqu'aux sites consommateurs (dans ce schéma les myofibrilles). Cette navette permet également d'augmenter la disponibilité en ADP au niveau mitochondrial et stimuler ainsi la synthèse énergétique. D'après (Hudsmith and Neubauer 2008).

Ce système des transferts énergétiques joue un rôle primordial dans la bioénergétique du cardiomyocyte et permet ainsi une fonction cardiaque en adéquation avec les besoins de l'organisme. Toutefois, une suppression de l'activité de la CK n'induit pas de dysfonction cardiaque importante (pour revue voir (Veksler, Kuznetsov et al. 1995, Ventura-Clapier, Kuznetsov et al. 1995)) ce qui suggère l'existence d'autres systèmes de transferts énergétiques. Enfin, il est intéressant de noter que la PCr produite n'est pas seulement impliquée dans ce mécanisme de transfert énergétique mais constitue également une réserve énergétique, faible, mais rapidement mobilisable en cas de fluctuations énergétiques importantes (pour revue voir (Saks, Ventura-Clapier et al. 1996)).

### c. La navette des adénylate kinases

L'adénylate kinase catalyse le transfert de liaison phosphate riche en énergie entre l'ADP et l'ATP selon la réaction suivante :  $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$

Trois différentes isoformes de cette enzyme sont retrouvées dans le myocarde et sont caractérisées par des localisations intracellulaires différentes. L'AK1 est localisée dans le cytoplasme, l'AK2 dans l'espace intermembranaire mitochondrial et enfin l'AK3 dans la matrice mitochondriale (pour revue voir (Dzeja and Terzic 2009)). L'AK1 pouvant se lier à proximité des ATPases cytoplasmiques (Lange, Auerbach et al. 2002), un système de navette, similaire à celui des CK, peut assurer un flux énergétique entre les mitochondries et les myofilaments. Cependant, le rôle des AK dans le turnover de l'ATP est minoritaire (environ 10%) et même si son activité augmente lorsque l'activité de la CK est diminuée (comme c'est le cas dans l'insuffisance cardiaque), l'AK n'est pas capable de compenser complètement cette diminution des flux énergétiques (Dzeja, Vitkevicius et al. 1999).

## **6. Les autres rôles de la mitochondrie**

La fonction mitochondriale n'est pas limitée à la production d'énergie. Cet organite, en communication directe avec le réticulum sarco-endoplasmique, est également impliqué dans le maintien de l'homéostasie calcique, participe à la thermogénèse et à la régulation du pH intracellulaire et joue un rôle majeur dans la signalisation liée aux espèces réactives de l'oxygène (la chaîne respiratoire est le premier site de production d'espèces réactives de l'oxygène de la cellule) et dans le processus de mort cellulaire par apoptose.

## **Chapitre II : Pathologie cardiaque et thérapies actuelles**

Le cœur est un organe dont l'activité nécessite le fonctionnement coordonné des systèmes d'excitation et de contraction et de production d'ATP mitochondrial. La fonction de pompe est donc soumise à un fonctionnement en flux tendu et sa perturbation va avoir des conséquences graves pour l'organisme. En réponse à un stress, l'organisme s'adapte pour maintenir un débit cardiaque suffisant (accélération du rythme cardiaque, vasoconstriction...). Toutefois, si ce stress est maintenu sur une longue période, ces adaptations deviennent délétères et vont aboutir au développement de l'insuffisance cardiaque.

### **I. L'insuffisance cardiaque**

D'après un rapport de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) datant de 2009, les maladies cardiovasculaires représentent la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité dans le monde et sont à l'origine de 17,1 millions de décès par an. En 2006, elles représentaient 28% des décès en France dont 23% seraient liés à l'insuffisance cardiaque (IC). L'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique complexe et multifactoriel caractérisé par une incapacité du cœur à maintenir un débit sanguin suffisant aux besoins de l'organisme. Les symptômes qui vont justifier des examens approfondis sont essentiellement une fatigabilité à l'effort ainsi qu'une dyspnée. Le diagnostic approfondi repose principalement sur l'étude par échocardiographie de paramètres structuraux (diamètres des cavités ventriculaires en systole et en diastole) et fonctionnels (fraction d'éjection systolique), sur la mesure du taux plasmatique de peptides natriurétiques, ou encore sur une électrocardiographie (pour détecter d'éventuels troubles du rythme).

Les causes les plus communes sont liées à une augmentation de la charge de travail du cœur, que ce soit lié à une perte de muscle cardiaque suite à un infarctus (40% des personnes ayant subi un infarctus du myocarde développent une insuffisance cardiaque (Arnold, Howlett et al. 2007)), à une exposition à une substance ou une situation cardiotoxique, comme les chimiothérapies et radiothérapies anticancéreuses, ou suite à une augmentation de la pression vasculaire (hypertension). Pour faire face à ces différents stress et à l'augmentation de la charge de travail, un processus complexe de remodelage est déclenché. Dans un premier temps ces adaptations sont bénéfiques mais elles peuvent par la suite devenir délétères et contribuer à la dysfonction cardiaque. Ce remodelage se caractérise entre autres par une hypertrophie des cardiomyocytes mais également par des modifications des propriétés



électriques des myocytes, de la régulation calcique, un stress oxydant, une altération du métabolisme énergétique et de la fonction contractile. Il existe également un remodelage de la matrice, avec l'apparition d'une fibrose et l'activation d'enzymes collagenolytiques qui vont aboutir à une dilatation de la cavité cardiaque (pour revue voir (Mudd and Kass 2008, Shah and Mann 2011)). De manière relativement récente, la mort cellulaire a également été impliquée dans le remodelage et le développement de la pathologie cardiaque. Alors que chez un individu sain, le taux de mort cellulaire est presque nul dans le myocarde : entre 1 et 11 cellules en apoptose selon les études pour  $10^5$  cellules, celle-ci est augmentée et atteint des taux compris entre 80 et 237 pour  $10^5$  cardiomyocytes chez les patients insuffisants cardiaques (Olivetti, Abbi et al. 1997, Guerra, Leri et al. 1999, Saraste, Pulkki et al. 1999). Dans un contexte où les cardiomyocytes ont une capacité très limitée à proliférer, une augmentation de la mort cellulaire, même faible, aggrave considérablement la fonction cardiaque. Pour prouver qu'un faible taux de mort cellulaire peut être responsable d'une dysfonction cardiaque, Wencker et al. ont généré un modèle de souris surexprimant de manière inductible et cardiospécifique une forme active d'une protéine effectrice de l'apoptose : la caspase 8 (Wencker, Chandra et al. 2003). Ils ont ainsi pu démontrer qu'un taux très faible de 23 cellules apoptotiques pour  $10^5$  cardiomyocytes (contre 1.6 pour  $10^5$  chez les souris contrôles), est suffisant pour engendrer une cardiomyopathie et une dysfonction cardiaque en seulement neuf semaines. Ce taux de mort cellulaire étant de 4 à 10 fois plus faible que celui mesuré sur des patients humains atteints d'insuffisance cardiaque, cette étude suggère que l'apoptose chronique pourrait jouer un rôle important dans le développement de la pathologie cardiaque.

## II. Les thérapies actuelles de l'insuffisance cardiaque

En dépit des nombreux traitements médicamenteux disponibles pour cette pathologie, la mortalité reste élevée et le pronostic est très mauvais : 50% des insuffisants cardiaques meurent dans les 5 ans qui suivent la déclaration du syndrome. Les principaux traitements actuellement utilisés sont les diurétiques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les  $\beta$ -bloquants (Gheorghiade, Cody et al. 2000, Klein, O'Connor et al. 2003).

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont les plus utilisés et reposent sur une inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette enzyme transforme l'angiotensine I en angiotensine II induisant une vasoconstriction. L'enzyme de conversion de l'angiotensine participe également à la dégradation de la bradykinine, une hormone

peptidique vasodilatatrice. Ainsi, l'inhibition de l'ICE entraîne une diminution de la concentration d'angiotensine II et de ce fait, le tonus vasculaire diminue et la pression artérielle baisse. De plus, la baisse des taux d'angiotensine II induit une diminution de la libération d'aldostérone de la corticosurrénale et a donc un effet sur le bilan hydrique.

Les diurétiques, principalement des inhibiteurs de l'aldostérone, diminuent la volémie et la rétention hydrosodée (Patterson, Adams et al. 1994), diminuant ainsi la charge de travail du cœur.

L'utilisation des  $\beta$ -bloquants est quelque peu paradoxale puisqu'ils diminuent la contraction du muscle cardiaque et contrecarrent l'effet du système adrénergique, utile pour le maintien du débit cardiaque. Malgré tout, leur efficacité est actuellement largement démontrée tant dans la réduction de la mortalité que dans la survenue d'événements indésirables graves.

Dans certains cas d'insuffisance cardiaque, une asynchronisation du myocarde se développe, diminuant l'efficacité mécanique de la systole et le débit cardiaque. Il y a une vingtaine d'années, une équipe française a développé une stratégie thérapeutique appelée stimulation cardiaque multisite qui permet, grâce à la pose d'un stimulateur (pacemaker), la resynchronisation du cœur et l'augmentation du débit cardiaque (Cazeau, Ritter et al. 1996). Cette méthode, désormais reconnue, améliore de manière significative la fonction cardiaque ainsi que la qualité et l'espérance de vie des patients (Cleland, Calvert et al. 2009).

En phase d'insuffisance cardiaque terminale, la seule stratégie actuellement disponible reste la transplantation cardiaque.

En dépit d'importants efforts produits par la recherche sur les pathologies cardiaques, la mortalité et les coûts sociaux économiques liés à ce syndrome restent malgré tout élevés. Il apparaît donc important de trouver de nouvelles stratégies médicamenteuses de l'insuffisance cardiaque plus ciblées, dont l'objectif serait de préserver directement la fonction myocardique. Le développement de la pathologie cardiaque, et plus particulièrement la transition du stade où les adaptations sont bénéfiques vers un stade où la fonction cardiaque est altérée est encore mal comprise. De nombreuses études sont ainsi menées avec pour objectif de mieux comprendre le développement de la pathologie et d'identifier de nouvelles voies de signalisations associées. En particulier, les voies de signalisations impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (stress RE) ont récemment fait l'objet d'étude dans le domaine cardiaque et représentent un domaine de recherche prometteur que je détaillerais dans le chapitre suivant.

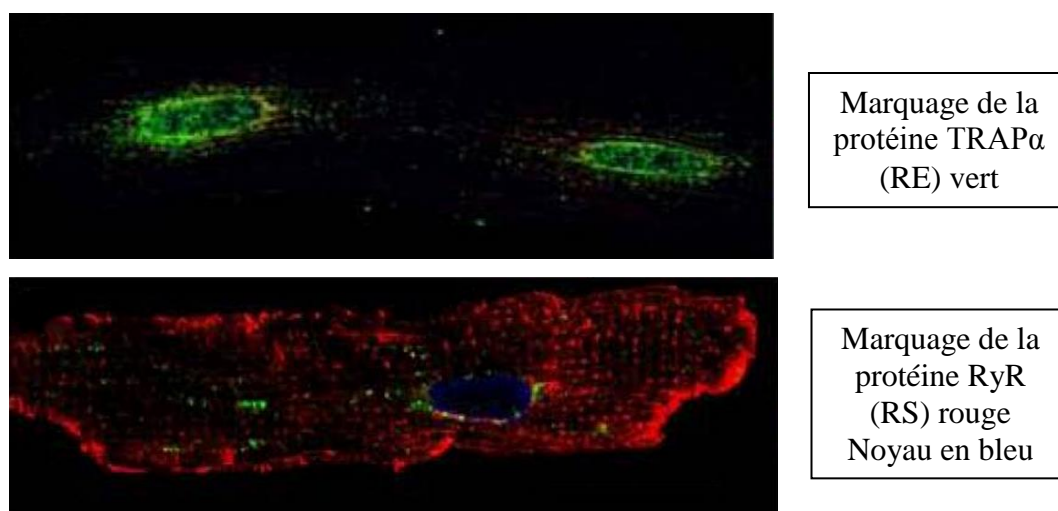


## **Chapitre III : Fonctions du RE, stress RE et pathologies cardiaques**

### **I. Existe-t-il plusieurs compartiments réticulaires dans le cœur ?**

Le réticulum endoplasmique a pour fonction principale la synthèse et la maturation des protéines, la synthèse des lipides et la régulation de l'homéostasie calcique. Dans la plupart des cellules, il existe un réticulum endoplasmique rugueux (RER) et un réticulum endoplasmique lisse (REL) (voir (Palade and Porter 1954, Palade 1955, Porter and Palade 1957)). Le RER est localisé dans la continuité du noyau, est recouvert de ribosomes et est donc principalement impliqué dans la synthèse et la maturation des protéines. Le REL, est présent dans la continuité du RER ou sous forme de vésicules dans le cytoplasme et permet la synthèse de lipides et la régulation de l'homéostasie calcique. Dans le cardiomyocyte et dans les cellules de muscles squelettiques, l'organisation réticulaire est différente et le réticulum est majoritairement de type sarcoplasmique. Ce type particulier de réticulum est considéré comme une forme évoluée et spécialisé de REL (Vertel, Walters et al. 1992, Volpe, Villa et al. 1992). Il est organisé en réseau de part et d'autre de la cellule, est richement équipé en protéines de la régulation calcique et est en contact avec les protéines contractiles et la membrane cellulaire au niveau des tubules T (diades). Cette organisation permet une libération et une recapture du calcium très efficace, indispensables pour les phénomènes de contraction/relaxation. Le RS est composé de deux régions distinctes, de morphologies et de fonctions différentes : le RS longitudinal et les citernes terminales. Le RS longitudinal est fin, organisé en réseau et fait le lien entre les différentes citernes terminales, qui correspondent à de gros renflements situés de part et d'autre des tubules T. Le RS longitudinal est majoritairement composé de protéines impliquées dans le pompage du calcium cytosolique (notamment l'ATPase cardiaque SERCA et son régulateur le phospholamban) et joue donc un rôle clé dans la relaxation du cardiomyocyte. Les récepteurs à la ryanodine (RyR) sont disposés sur les membranes des citernes terminales, sont activés par le calcium ce qui provoque la libération du calcium du RS dans le cytosol et sont donc responsables de la contraction (Rossi, Barone et al. 2008). Pendant très longtemps, le RS a été considéré comme le seul type de réticulum présent dans les cardiomyocytes, assurant ainsi l'ensemble des fonctions réticulaires de la cellule et notamment la synthèse et le repliement des protéines. En faveur de cette hypothèse, il a été démontré que dans le muscle squelettique le marquage

de protéines impliquées dans la synthèse des protéines (BIP, PDI ou RibII) colocalise avec un marquage de protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique telles que SERCA et calsequestrine (Kaisto and Metsikko 2003). De plus, la chaperonne BiP est retrouvée dans des fractions de RS purifiées (Volpe, Villa et al. 1992). Cependant, cette conception a récemment été remise en cause et l'hypothèse de l'existence dans le cardiomyocyte de membranes de RE indépendantes du RS a été proposée. Le RE pourrait ainsi être un organe clairement différencié du RS, situé majoritairement à proximité des noyaux qui assurerait la synthèse et la maturation des protéines. Pour illustrer cette théorie, une expérience d'immunofluorescence réalisée par MacFarland et al. montre qu'un marquage du RE, utilisant un anticorps dirigé contre la chaperonne membranaire TRAP $\alpha$  (en vert), présente une localisation péri-nucléaire alors qu'un marquage du RS, utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur à la ryanodine (en rouge), présente un marquage en réseau de part et d'autre de la cellule (figure 9, (McFarland, Milstein et al. 2010))

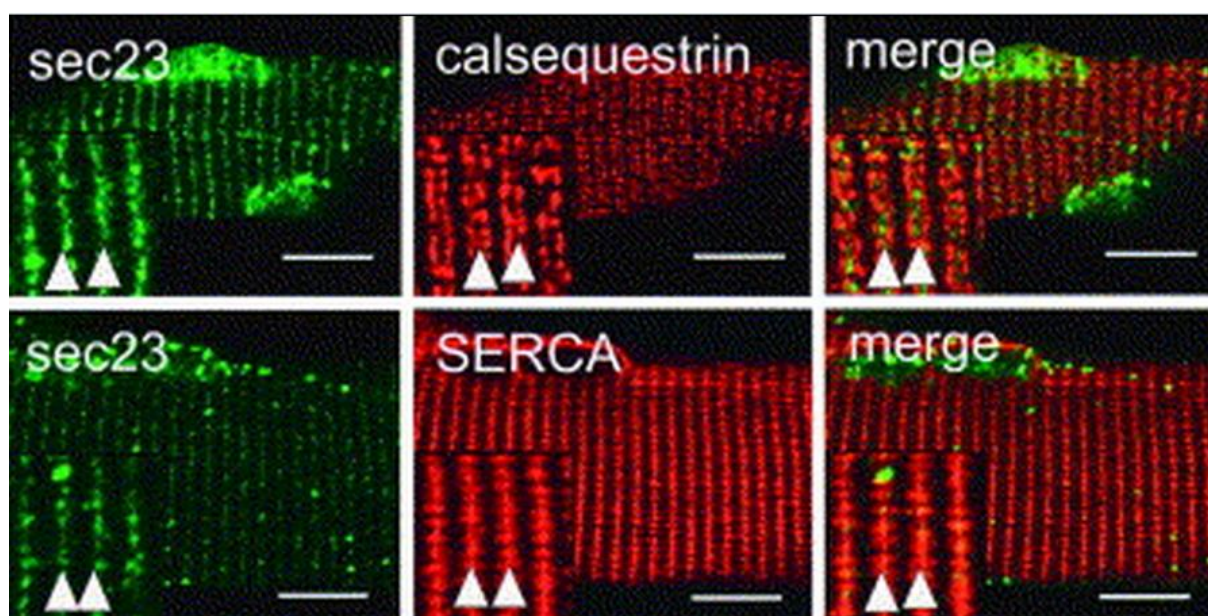


**Figure 9 : Localisation RE/RS (d'après (McFarland, Milstein et al. 2010))**

*La localisation de TRAP $\alpha$ , impliquée dans la synthèse des protéines, est essentiellement péri-nucléaire. Le récepteur à la ryanodine, qui joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie calcique, présente une localisation en réseau de part et d'autre de la cellule.*

De plus, des protéines impliquées dans la synthèse des protéines (BiP, PDI, TRAP $\alpha$ ...) ont une solubilité très différente de celle de SERCA, ce qui suggère que ces protéines sont localisées dans des environnements très différents (Kaakinen, Papponen et al. 2008). Enfin, il a été montré que Sec23, protéine du RE, colocalise partiellement avec SERCA et calsequestrine, protéines du RS (figure 10, (Kaisto and Metsikko 2003)).

Ces observations suggèrent donc que le RE et le RS ne sont pas des organites complètement distincts mais plutôt des compartiments qui communiquent entre eux. Il existerait donc des compartiments de réticulum plutôt adaptés pour la synthèse des protéines, largement équipés en protéines chaperonnes mais faiblement en protéines régulatrices de l'homéostasie calcique et d'autres compartiments mieux adaptés à la régulation du calcium et du couplage excitation/contraction. Dans un souci de clarté, je nommerai par la suite RE le compartiment réticulaire impliqué dans la synthèse protéique et RS le réticulum impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique, même si comme nous venons de le voir, la différence entre ces deux organites reste difficile à définir.



**Figure 10 : Colocalisation partielle RE et RS (Kaisto and Metsikko 2003).**

*Une protéine impliquée dans la synthèse des protéines, sec23, colocalise partiellement avec deux protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique, SERCA et calsequestrine.*

## II. Les fonctions physiologiques du RE

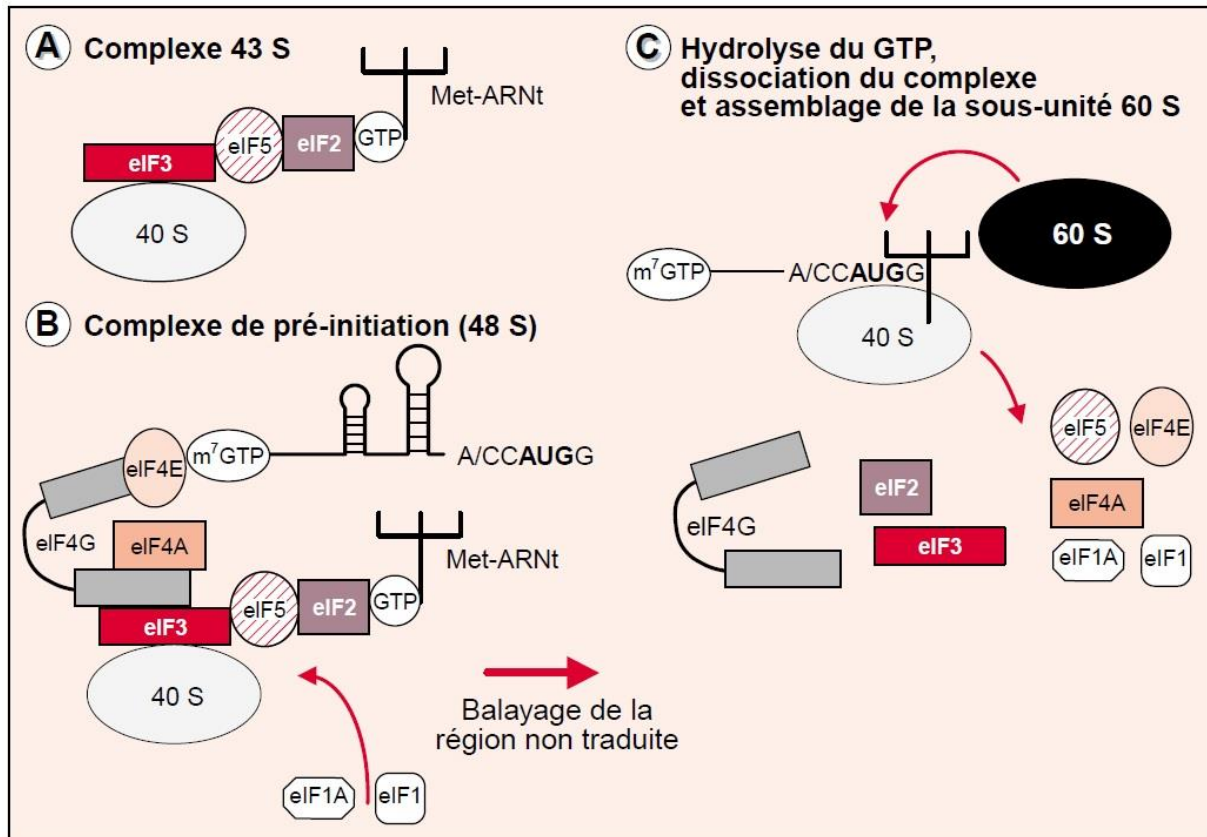
Le réticulum endoplasmique a pour fonctions principales la synthèse et repliement des protéines membranaires, sécrétées et destinées aux organites.

### A. La synthèse des protéines

La synthèse des protéines, correspondant à la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéine, est un processus complexe et finement régulé que l'on peut décrire en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction.

#### 1. Initiation de la traduction

La traduction débute par la liaison d'un complexe ternaire, composé de l'ARNt méthylé, d'eIF2 (eukaryotic Initiation Factor, constituée de trois sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et d'une molécule de GTP, à la petite sous unité du ribosome (40S) par l'intermédiaire d'eIF3 et d'eIF5. Le complexe 43S ainsi formé, s'associe à l'ARNm par l'intermédiaire d'eIF4F (composé d'eIF4A, eIF4E et d'eIF4G), spécifiquement lié à la coiffe méthylée en 5' de l'ARNm, pour former le complexe de pré-initiation de la traduction (complexe 48S). L'activité d'hélicase d'eIF4A permet la linéarisation de l'ARNm en supprimant les appariements intramoléculaires pour permettre le déplacement du complexe 48S le long de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation AUG (codant la méthionine). Une fois le complexe situé au niveau du codon d'initiation, eIF2 lié au GTP, déclenche la traduction en créant un lien entre l'ARNt<sup>met</sup> fixé sur sa sous unité  $\gamma$  et le codon d'initiation 5'-AUG-3'. L'anti-codon 5'-UAC-3' de l'ARNt<sup>met</sup> se fixe au codon d'initiation, ce qui déclenche l'hydrolyse de la molécule de GTP liée à eIF5, la dissociation des facteurs d'initiation et l'association de la grande sous unité ribosomale (60S) avec la petite sous unité (40S). L'ARNm est alors pris entre les deux sous unités ribosomale et peut donc coulisser par rapport au ribosome (figure 11).

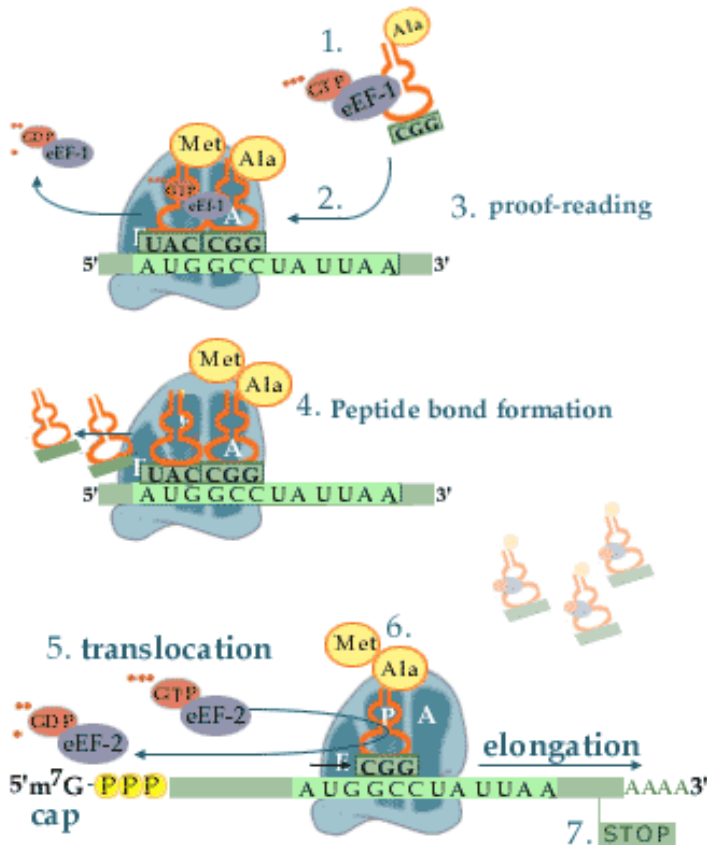


**Figure 11 : Initiation de la traduction : reconnaissance du codon AUG par le complexe eIF-2/ARNt<sup>met</sup> (Ohlmann 2000)** (A) La liaison du complexe ternaire (Met-ARNt, eIF2, GTP) au ribosome forme le complexe 43S. (B) La formation du complexe de pré-initiation (48 S) est la résultante de la liaison du complexe 43S par l'intermédiaire d'eIF4F. (C) L'initiation est déclenchée par eIF2 qui fait le lien entre l'ARNt et l'ARN traduit et se poursuit grâce à la dissociation des facteurs d'initiation et au recrutement de la grande sous unité ribosomale 60 S.



## 2. Elongation

Une fois initiée par le facteur d'initiation eIF2, la traduction se poursuit grâce au facteur d'élongation eEF1 lié au GTP et à un ARNt. Si cet ARNt possède l'anticodon correspondant au second codon (codon situé à la suite du codon d'initiation), le lien codon-anticodon est créé, ce qui déclenche l'hydrolyse du GTP d'eEF1 et la formation de la liaison peptidique entre la méthionine (l'acide aminé n°1) et l'acide aminé n°2. Le facteur d'élongation eEF2, grâce à son activité GTPasique permet la poursuite de la traduction en faisant coulisser l'ARNm par rapport au ribosome (processus appelé translocation) et en rendant accessible le ribosome à l'ARNt possédant l'anticodon correspondant au codon suivant. La synthèse de la chaîne polypeptidique continue grâce à la répétition successive de ces cycles (figure 12).



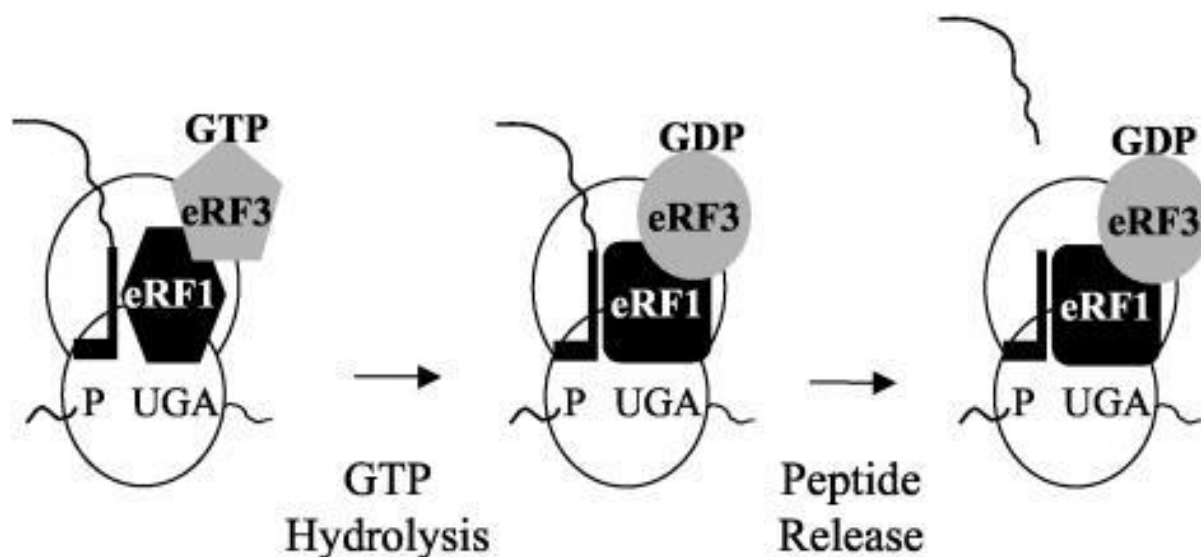
**Figure 12 :**

### ***Elongation de la chaîne polypeptidique***

*La reconnaissance du second codon par l'ARNt possédant l'anticodon correspondant, entraîne l'hydrolyse du GTP d'eEF1, lié à l'ARNt, permettant la formation de la liaison peptidique entre la méthionine et l'acide aminé n°2. L'hydrolyse du GTP du facteur d'élongation eEF2, fait coulisser l'ARN par rapport au ribosome permettant la poursuite de la traduction (d'après <http://www.nobelprize.org>)*

### 3. Terminaison

Lorsqu'un codon stop se situe au niveau du ribosome, la reconnaissance de ce codon par le facteur de terminaison de la traduction eRF1 amorce la fin de la traduction. L'activité GTPasique d'eRF3 lié à eRF1 entraîne la rupture de la liaison entre le dernier acide aminé et l'ARNt. La protéine est alors libérée et le complexe ribosomal se dissocie, ce qui marque la fin de la traduction (figure 13).



**Figure 13 : Terminaison de la traduction : hydrolyse de la liaison ARNt-acide aminé.**

La reconnaissance du codon stop par eRF1 entraîne l'hydrolyse du GTP d'eRF3, la libération de la chaîne polypeptidique et la dissociation du complexe ribosomal. (Salas-Marco and Bedwell 2004).

L'ensemble du processus de traduction est rapide puisqu'il permet la synthèse de 5 à 10 acides aminés par seconde et ainsi, une protéine d'une taille de 50kDa est produite en environ 64 secondes. Le fruit de la traduction est une protéine dont la structure est primaire, c'est-à-dire sous la forme d'une chaîne linéaire d'acides aminés, déterminée par sa séquence. La protéine entame alors un processus de maturation lui permettant d'acquérir une structure secondaire puis tertiaire puis éventuellement quaternaire (assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques).

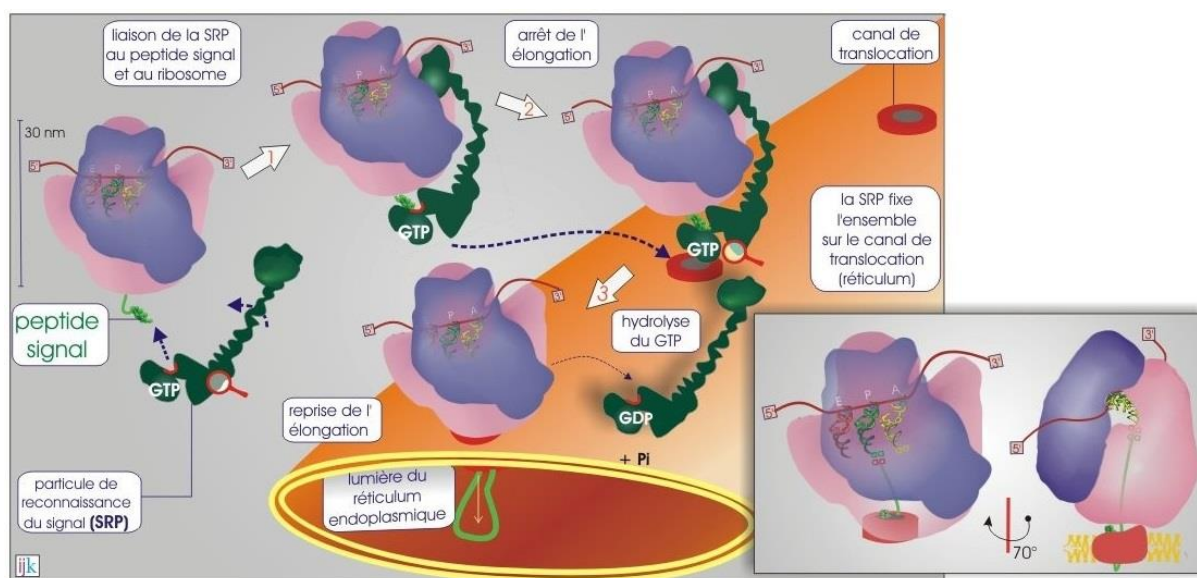
## B. Le repliement des protéines

Pour assurer sa fonction biologique, une protéine doit acquérir une structure tridimensionnelle adéquate grâce à un processus appelé repliement ou maturation. La majorité des protéines (environ 75%) se replient de façon spontanée en fonction de la charge des différents acides aminés dont elles sont composées. Pour se replier correctement, les autres protéines nécessitent l'assistance de protéines appelées chaperonnes. Les chaperonnes sont des ATPases qui ont la capacité d'héberger et d'offrir un refuge temporaire aux séquences hydrophobes des protéines naissantes qui pourraient être à l'origine d'agrégation interprotéiques interférant avec le repliement. Elles favorisent ainsi le repliement correct des protéines chaperonnées, appelées protéines clientes. Les protéines adoptent ainsi une structure secondaire avec la présence de motifs structuraux particuliers tels que les hélices ( $\alpha$ ,  $3_{10}$ ,  $\Pi$ ), les brins et feuillets  $\beta$ , les coudes, etc. La structure tertiaire d'une protéine est la conformation finale d'une chaîne polypeptidique. Cette structure est maintenue par différents types d'interactions. Ces interactions peuvent être de type électrostatiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes), des liaisons de van der Waals, des interactions avec le solvant et l'environnement (ions, lipides...), mais aussi des liaisons covalentes formées par des ponts disulfures entre les résidus cystéines. Ce dernier type de liaison nécessite l'activité d'enzymes particulières (comme par exemple les PDI, Protein Disulfide Isomerase) et d'un environnement très oxydant. Ces liaisons ne peuvent donc pas être formées dans le cytoplasme, elles ne peuvent être réalisées que dans le réticulum endoplasmique. On peut ainsi différencier deux types de protéines, les protéines qui sont synthétisées par des ribosomes libres et qui subissent le processus de maturation dans le cytosol (avec ou sans l'aide de protéines chaperonnes) et les protéines qui sont synthétisées par des ribosomes liés au RE et qui vont subir une maturation plus importante dans le RE (création de ponts disulfure, N-glycosylation...). Les protéines qui sont synthétisées par des ribosomes libres représentent 70% des protéines et seront destinées au cytoplasme ou à des organites intracellulaires tels que le noyau ou la mitochondrie. Les protéines synthétisées par les ribosomes du RE constituent les 30% restants et seront adressées aux membranes plasmiques (canaux ioniques, transporteurs...), au RE (chaperonnes, récepteurs KDEL...), au golgi, aux lysosomes (protéases, lipases...) ou sécrétées (albumine, facteurs de croissances, insuline...) (Ghaemmhami, Huh et al. 2003).

La traduction de ces protéines commence dans le cytosol et la protéine est ensuite importée de manière co-translationnelle dans le RE grâce à la présence d'un peptide signal. Le

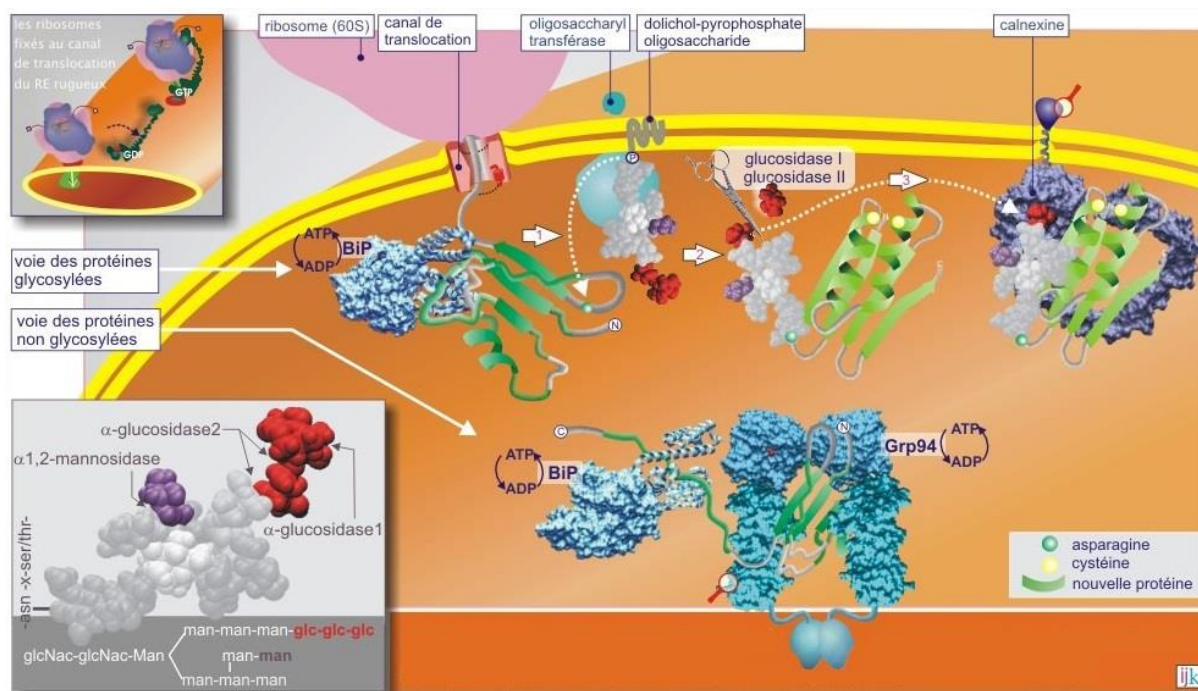


peptide signal est une séquence spécifique et hydrophobe de 3 à 30 acides aminés située à l'extrémité N-terminale de la protéine qui est reconnue par les SRP (Signal Recognition Particle), des complexes composés de 6 protéines, d'ARN et de GTP (Nagai, Oubridge et al. 2003, Sauer-Eriksson and Hainzl 2003). Le SRP se lie au peptide signal, au niveau du ribosome d'où émerge la protéine et à la membrane du RE, par l'intermédiaire du récepteur SRP, lui-même lié au canal de translocation PCC (pour Protein Conducting Channel, un pore d'environ 4nm) (Gorlich, Hartmann et al. 1992, Gorlich, Prehn et al. 1992, Gorlich and Rapoport 1993). La fixation du SRP sur le ribosome suspend la poursuite de la traduction en bloquant l'accès des facteurs d'élongation eEF1 et eEF2, évitant ainsi que la protéine destinée au RE soit relarguée dans le cytosol. Une fois le SRP fixé à son récepteur, le GTP est hydrolysé, entraînant le détachement du ribosome et la reprise de la traduction (figure 14). Cette translocation co-traductionnelle des protéines dans le RE ne se fait que lorsque la chaîne polypeptidique compte au moins 70 acides aminés (40 encore dans le ribosome et 30 transitant par le canal de translocation (Johnson and van Waes 1999). Le peptide signal, nécessaire pour la translocation de la protéine dans le RE ne fait pas partie de la protéine mature et doit donc être excisé de manière co- ou post-traductionnelle par le complexe protéique signal peptidase (SP), composé de 6 sous unités (Evans, Gilmore et al. 1986) et situé sur la membrane interne du RE.



**Figure 14 : Reconnaissance du peptide signal et acheminement co-traductionnel vers le réticulum.** Le peptide signal est reconnu par SRP, ce qui suspend la traduction. Le complexe ainsi formé se fixe au récepteur du SRP puis la traduction reprend. La protéine en cours de synthèse est alors acheminée de manière co-traductionnelle dans le RE à travers le canal de translocation (PCC). D'après <http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>

Pour éviter l'accumulation de protéines mal repliées et la formation d'agrégats, le RE dispose d'un nombre important de protéines impliquées dans le repliement des protéines, de manière à assurer une capacité de repliement supérieure à la quantité de protéines naissantes entrant dans le RE. Le repliement des protéines est assuré par des protéines chaperonnes. La fixation d'une protéine cliente à sa chaperonne empêche un mauvais repliement ou la formation d'agrégats. GRP78/BiP (Glucose-Related Protein 78/Binding Immunoglobulin Protein) est la protéine la plus abondante du RE. Cette chaperonne a une forte affinité pour des séquences de 7-8 acides aminés hydrophobes présentes sur les protéines naissantes. Son interaction avec les protéines clientes est dépendante de l'ATP dont l'hydrolyse assure un événement du cycle d'association/dissociation (Melnick, Dul et al. 1994, Gething 1999). Une fois partiellement repliées, les protéines clientes sont prises en charge par une autre chaperonne, GRP94 (Glucose-Related Protein 94), qui s'insère dans des crevasses de la protéine grâce à un doigt amphipatique. Dans le processus de maturation des protéines, l'addition cotraductionnelle d'un oligosaccharide, appelée N-glycosylation, est spécifique du RE. Cet oligosaccharide qui est composé de 14 résidus glucidiques comprenant 2 acétylglucosamines, 9 mannoses et 3 glucoses, est ajouté sur le groupement NH<sub>2</sub> d'un résidu asparagine par l'oligosaccharyl-transférase (OST) (Burda, Jakob et al. 1999). Ce processus de N-glycosylation est primordial puisqu'il joue un rôle dans l'adressage, la maturation et dans le contrôle qualité du repliement correct des protéines en empêchant notamment la translocation des protéines dans le cytoplasme tant que les protéines ne sont pas correctement repliées (Wormald and Dwek 1999). Les résidus glucoses sont ensuite enlevés successivement et de manière réversible par les  $\alpha$ -glucosidases I et II. Seule la protéine monoglucosylée est reconnue par les chaperonnes calnexine ou calreticuline (Hammond, Braakman et al. 1994), qui permettent le repliement protéique et la rétention des protéines mal conformées (Williams 2006). Lorsque la protéine cliente aura atteint un certain degré de repliement, le dernier glucose est éliminé par l' $\alpha$ -glucosidase II (figure 15). Si la protéine n'a pas atteint son état de repliement définitif (appelé « native fold »), elle est reconnue par la glucosyltransférase UGGT (par reconnaissance de séquences hydrophobes et du N-acétylglucosamine uniquement accessible sur les protéines mal repliées), reglucosylée en position 1 et de nouveau fixée par les chaperonnes calnexine ou calréticuline (Sousa, Ferrero-Garcia et al. 1992, Taylor, Ferguson et al. 2004). Ce cycle peut se répéter plusieurs fois jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée ou dégradée (en cas de repliement incorrect persistant) et constitue une étape importante du contrôle qualité du repliement des protéines (Ireland, Niggemann et al. 2006).



**Figure 15 : Repliement des protéines naissantes dans le RE : fixation des chaperonnes et N-glycosylation.** Les protéines naissantes sont repliées dans le RE grâce à l'assistance des protéines chaperonnes (notamment GRP78, GRP94 et calnexine). La N-glycosylation participe au repliement des protéines et constitue un système de contrôle qualité du bon repliement des protéines. D'après <http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>.

Deux systèmes de dégradation des protéines coopèrent dans le RE, la voie ERAD (pour Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation) qui est majoritaire et dégrade les protéines solubles et la macro-autophagie qui permet de dégrader les agrégats de protéines non solubles (Bernales, McDonald et al. 2006). Les protéines N-glycosylées mal repliées subissent le clivage d'un mannose par l'enzyme ER  $\alpha$ 1,2 mannosidase de type I. La conformation obtenue à 8 résidus mannose ne peut être reconnue par UGGT, mais est reconnue par EDEM (pour ER Degradation Enhancing  $\alpha$ 1,2 Mannosidase like protein) qui favorise la translocation de la protéine dans le cytoplasme via le canal Sec61 $\alpha$ . Cette protéine est alors poly-ubiquitinilée, reconnue, puis détruite par le protéasome (Jarosch, Lenk et al. 2003, McCracken and Brodsky 2005).

A la différence de l'environnement réducteur du cytoplasme, l'environnement du RE est oxydant. Cet environnement oxydatif va permettre la formation de ponts disulfures entre deux résidus cystéines qui caractérisent la majorité des protéines synthétisées dans le RE. Ce repliement oxydatif est effectué par la famille des PDI et permet la stabilisation des protéines en réduisant leur entropie configurationnelle dans l'état non replié. Pour former ce pont

disulfure, les PDI oxydent les groupements SH de deux résidus cystéines. Les électrons et protons arrachés lors de cette opération sont provisoirement hébergés par les disulfides (S-S) du site catalytique de la PDI puis sont pris en charge par l'oxydoréductine ERO1-L qui transporte les protons et électrons vers son co-facteur le FAD, le convertissant en FADH<sub>2</sub>. Enfin, la réaction se termine lorsque les protons et électrons sont cédés à l'oxygène, l'accepteur final d'électrons, pour donner de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, la formation de pont disulfure et donc la maturation des protéines dans le RE est un processus générateur d'espèces réactives de l'oxygène qui contribuent à l'environnement oxydant du RE. Les protéines matures qui ne sont pas destinées à faire partie de la membrane du RE, ni à être sécrétées hors de la cellule sont ensuite dirigées vers l'appareil de Golgi.

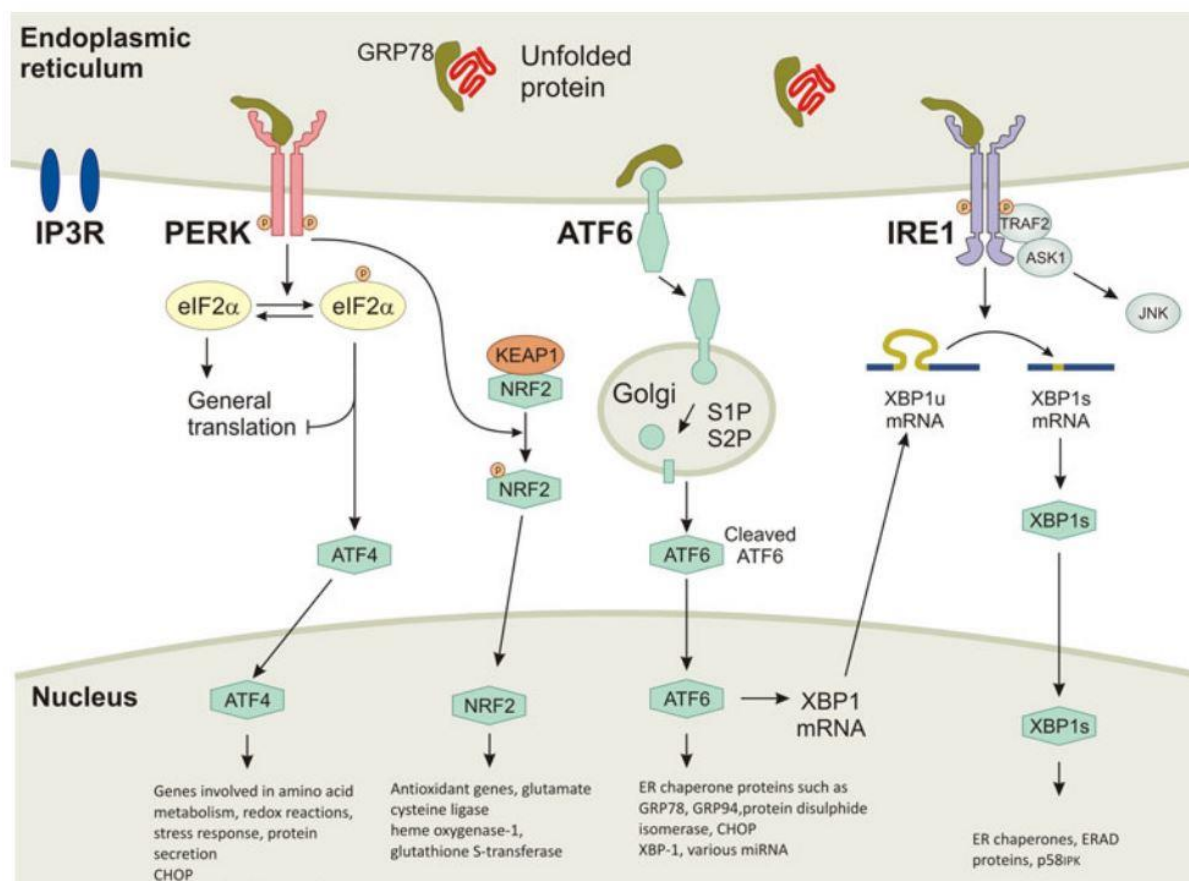
### III. Le stress du réticulum endoplasmique

#### A. La réponse au stress du réticulum endoplasmique

Sous le terme stress RE, on regroupe les différentes perturbations empêchant un fonctionnement correct du RE qui aboutissent à l'accumulation des protéines mal repliées comme par exemple, un dysfonctionnement de la N-glycosylation des protéines, un stress oxydant ou encore une modification de l'homéostasie calcique intraluminal.

En réponse au stress RE, un mécanisme compensatoire appelé réponse UPR (Unfolded Protein Response) est activé. L'activation de cette réponse a pour but de permettre à la cellule de restaurer l'homéostasie du RE grâce à la combinaison de différentes actions : (i) la réduction des synthèses protéiques pour empêcher l'accumulation de nouvelles protéines dans le RE, (ii) l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes pour augmenter les capacités de repliement et de maturation du RE, et (iii) la dégradation des protéines mal repliées pour limiter l'engorgement du RE (Ron and Walter 2007). Chez les Mammifères, cette réponse complexe et coordonnée entraîne l'activation de trois senseurs proximaux : la kinase PERK (PKR-like ER protein Kinase), le facteur de transcription ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et la kinase/endoribonucléase IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1). Ces protéines transmembranaires sont normalement maintenues inactives par l'association de leur domaine luminal avec la protéine chaperonne GRP78/BiP. En réponse au stress RE, GRP78/BiP s'associe aux protéines mal repliées accumulées dans le RE, se dissociant ainsi de ces trois senseurs, ce qui initie la réponse UPR (Bertolotti, Zhang et al. 2000). La figure 16 illustre les mécanismes moléculaires déclenchés lors de la réponse UPR.





**Figure 16. Activation de la voie UPR en réponse au stress RE.** En absence de stress RE, les protéines transmembranaires ATF6, PERK et IRE1 sont maintenues inactives par association avec la protéine chaperonne GRP78/BiP. En réponse au stress RE, la liaison de GRP78/BiP aux protéines mal repliées entraîne sa dissociation des trois senseurs et leur activation. L'activation de PERK permet la phosphorylation d'eIF2α, ce qui diminue la majorité des synthèses protéiques de novo et permet l'expression d'ATF4, un facteur de transcription régulant des gènes de réponse au stress. PERK phosphoryle également NRF2, qui peut alors réguler des gènes de réponse à un stress oxydant. ATF6 migre vers le Golgi où elle est clivée (par S1P et S2P), puis son extrémité N-terminale transloque au noyau où elle se fixe sur les séquences ERSE (ER Stress response Element) pour activer la transcription des gènes de la réponse UPR. Une fois activée, IRE1 provoque l'épissage de l'ARNm de XBP1 qui, une fois traduit, se fixe sur les séquences ERSE des promoteurs des gènes cibles de la réponse UPR. L'activation d'IRE1 permet la formation de l'UPRosome, un complexe protéique formé notamment par TRAF2 et ASK1, permettant entre autre la phosphorylation de JNK (Deegan, Saveljeva et al. 2013).

## 1. Régulation de la branche ATF6 de la réponse UPR

Après sa dissociation d'avec GRP78/BiP, ATF6 transloque à l'appareil de Golgi où elle est activée par clivage via des protéases à sérine (S1P, S2P) (Namba, Ishihara et al. 2007). Le domaine N-terminal d'ATF6 est alors libéré dans le cytosol et migre dans le noyau pour induire la transcription des gènes de la réponse UPR en se fixant aux séquences ERSE (ER Stress Response Element) de leur promoteur. Il permet entre autres, la transcription de CHOP (C/EBP homologous protein), un facteur de transcription pro-apoptotique dont le promoteur est régulé par les trois branches de la voie UPR (Oyadomari and Mori 2004), ainsi que la transcription de protéines impliquées dans la voie de dégradation des protéines du RE (voie ERAD), de protéines chaperonnes comme GRP78 et PDIA6 et de XBP1 (Yoshida, Matsui et al. 2001).

## 2. Régulation de la branche IRE1 de la réponse UPR

Suite à sa libération par GRP78/BiP, la dimérisation et la trans-autophosphorylation de IRE1 déclenchent son activité RNase, qui permet l'épissage d'un intron de 26 nucléotides de l'ARNm de XBP1 (X-box Binding Protein 1), préalablement induit par ATF6 (Calton, Zeng et al. 2002). L'ARN épissé est traduit en un facteur de transcription qui se fixe sur les séquences ERSE et stimule la transcription des gènes de la réponse UPR. Les gènes cibles de XBP1s peuvent varier suivant les tissus et les modèles étudiés mais sont généralement impliqués dans le repliement des protéines, la voie ERAD, la translocation des protéines dans le RE et leur sécrétion (Lee, Iwakoshi et al. 2003). En plus de son rôle dans la régulation de l'ARNm de XBP1, IRE1 interagit avec plusieurs protéines dont TRAF2 pour former un complexe nommé UPRosome (Hetz 2012) permettant l'activation de protéines telles que ASK1 et JNK et la régulation de voies de signalisations impliquant par exemple NF- $\kappa$ B et ERK (pour revue voir (Woehlbier and Hetz 2011)). L'activité d'endoribonucléase d'IRE1 est de plus impliquée dans le clivage de nombreux ARNm codant des protéines sécrétées, non pas dans le but de les activer, mais pour favoriser leur dégradation et ainsi soulager le RE de la charge de protéines à gérer, et permettre un retour à l'homéostasie réticulaire (processus appelé RIDD pour regulated IRE1-dependant degradation (Hollien, Lin et al. 2009)).

### 3. Régulation de la branche PERK de la réponse UPR

La dissociation de GRP78/BiP de PERK entraîne l'activation de cette kinase par trans-autophosphorylation (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Le rôle principal de PERK dans la régulation de la voie UPR est la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , ce qui inhibe son activité et atténue ainsi les néosynthèses protéiques (Harding, Zhang et al. 1999). En effet, la phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$  inhibe l'activité GTPasique de ce facteur d'initiation par inhibition de l'échange avec eIF2B d'une molécule de GDP contre une molécule de GTP. Sans l'activité GTPasique d'eIF2, les facteurs d'initiation restent fixés au complexe de pré-initiation après la reconnaissance de l'ARNt initiateur, ce qui empêche la fixation de la grande sous unité ribosomale et empêche ainsi le démarrage de la traduction (Nika, Rippel et al. 2001). L'inhibition de la traduction a deux conséquences positives : elle limite (i) la néosynthèse des protéines et donc la charge de travail du RE et (ii) la production d'espèces réactives de l'oxygène induites par la maturation des protéines lors de la formation de ponts disulfures (Back, Scheuner et al. 2009). Bien qu'elle diminue de manière générale la synthèse des protéines, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  permet également la traduction d'ARNm spécifiques grâce à la reconnaissance dans leur région 5' d'une petite phase ouverte de lecture, appelée  $\mu$ ORF (micro Open Reading frame), qui n'est pas traduite dans une situation physiologique. Le facteur de transcription ATF4, qui contrôle l'expression de protéines chaperonnes et de protéines impliquées dans le maintien du statut redox de la cellule (Harding, Zhang et al. 2003), est notamment traduit en réponse à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . ATF4 régule également l'expression de protéines jouant un rôle dans l'apoptose telles que CHOP et GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34). GADD34 s'associe à Nck (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein) et Crep (Constitutive Repressor of eIF2alpha Phosphorylation) formant un complexe permettant le recrutement de la phosphatase PP1C exerçant un rétrocontrôle négatif de l'activation de la voie PERK en déphosphorylant eIF2 $\alpha$  (Latreille and Larose 2006). Récemment, une étude a révélé que PKR (Protein Kinase R), une autre kinase phosphorylant eIF2 $\alpha$ , est également activée par le stress RE et pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de cette branche de la voie UPR (Raven and Koromilas 2008). PERK phosphoryle également KEAP1, ce qui entraîne la dissociation de KEAP1 de NRF2, permettant la translocation de ce dernier dans le noyau (Itoh, Wakabayashi et al. 1999, Cullinan, Zhang et al. 2003). Une fois dans le noyau, NRF2 active la transcription de nombreux gènes impliqués dans les défenses anti-oxydantes de la

cellule parmi lesquels on peut citer HO-1, GST, UGT ou Mrps (Hayes, Chanas et al. 2000, Wang and Dore 2007, Yueh and Tukey 2007, Jarmi and Agarwal 2009).

#### 4. Relations entre les différentes branches de la voie UPR

Outre le lien que représente XBP1 entre les branches ATF6 et IRE1, d'autres protéines ont été impliquées dans la communication entre les différentes branches de la voie UPR. P58<sup>IPK</sup> (Protein 58kDa Inhibitor of the eIF2 $\alpha$  Protein Kinases PKR), une protéine chaperonne de la famille des Hsp40, dont l'expression est activée par ATF6 en réponse au stress RE, déphosphoryle PERK et ainsi limite l'activation de cette branche en réponse au stress RE (Yan, Frank et al. 2002). Ce rétrocontrôle négatif permet d'éviter une suractivation délétère de PERK et joue ainsi un rôle protecteur en favorisant le retour à l'homéostasie (Rutkowski, Kang et al. 2007). P58<sup>IPK</sup> est localisée dans le RE ou dans le cytoplasme et son action sur PERK est régulée par GRP78va, une isoforme tronquée issue d'un épissage alternatif de l'ARNm de GRP78, générant une protéine qui n'a pas la séquence d'adressage au RE et qui est donc cytosolique (Ni, Zhou et al. 2009).

Les micro ARN (MiR), sont des ARN non codants endogènes d'une taille moyenne de 22 nucléotides qui modulent l'expression des gènes en induisant la dégradation ou en inhibant la traduction des ARN. Les MiR ont récemment été décrits comme des régulateurs importants de l'expression des gènes impliqués dans les pathologies cardiaques (Small, Frost et al. 2010). Un MiR peut réguler à lui seul l'expression d'un nombre important de gènes et ainsi être impliqué dans un grand nombre de processus (Mallat, Tritsch et al. 2014). Récemment, plusieurs MiR ont été identifiés comme régulateurs ou comme étant régulés par la réponse UPR (pour revue voir (Maurel and Chevet 2013)). Parmi ces MiR, certains participent à la communication entre les différentes branches de la voie UPR. Par exemple, le MiR 30c 2\* est activé par la branche PERK et inhibe l'expression de XBP1. De plus, l'inhibition du MiR 214 par la voie UPR permet de lever l'inhibition de la traduction de l'ARNm d'ATF4.

Ces dernières découvertes remettent ainsi en cause la représentation classique de la voie UPR avec trois branches clairement distinctes et arguent en faveur d'un modèle où les différentes branches peuvent se réguler mutuellement afin de moduler plus finement cette réponse UPR. Les mécanismes de cette voie de signalisation s'avèrent donc plus complexes que ce que l'on pensait il y a quelques années et ne sont toujours pas entièrement élucidés.

Comme nous venons de le voir, la réponse UPR est une réponse adaptative qui a pour but de restaurer l'homéostasie et le fonctionnement correct du RE. Néanmoins, dans le cas



d'un stress RE excessif ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la cellule est éliminée par apoptose pour limiter les dommages à l'organisme. Les voies de signalisations impliquées dans ce type de mort seront donc abordées dans le paragraphe suivant.

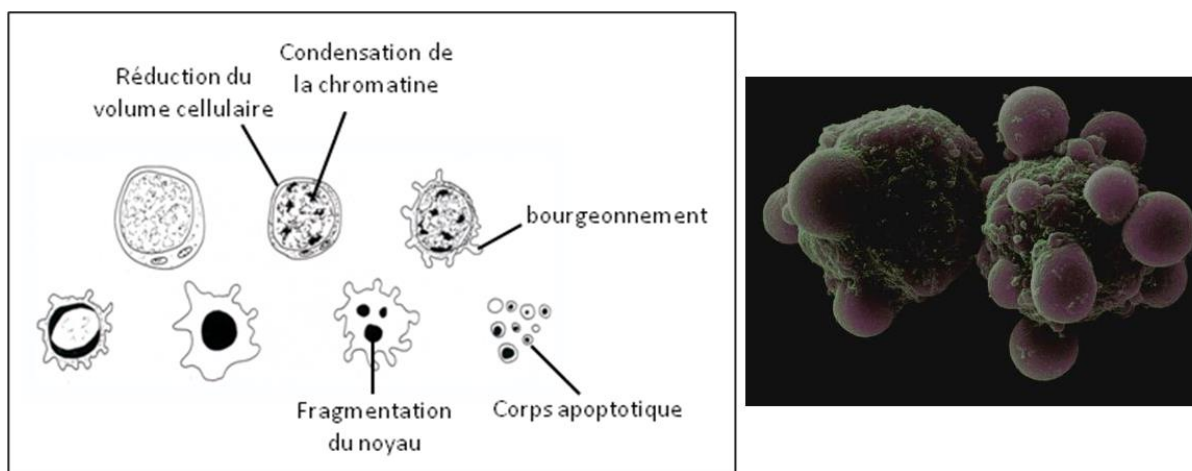
## B. Mort cellulaire et apoptose dans le cœur

La mort cellulaire est essentielle au cours du développement des organismes pluricellulaires. En effet, elle est impliquée dans des processus morphogénétiques variés tels que la disparition du tissu interdigital chez les vertébrés supérieurs (Garcia-Martinez, Macias et al. 1993), la mise en place du dimorphisme sexuel chez les mammifères (Jacobson, Weil et al. 1997), l'élimination des structures transitoires chez les insectes (Schwartz 1992) et la maturation fonctionnelle du système nerveux (Hamburger, Brunso-Bechtold et al. 1981). Chez l'adulte, la mort cellulaire est nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire, en permettant l'élimination des cellules inutiles, abîmées ou dangereuses pour l'organisme comme les lymphocytes auto-réactifs (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992), les cellules infectées par un virus (Vaux, Haecker et al. 1994), ou encore les cellules tumorales (Williams 1991). Dans le cœur, puisqu'il est considéré que les cardiomyocytes ne possèdent pas de potentiel de prolifération, la mort cellulaire est un processus très délétère pour la fonction cardiaque car chaque cellule morte est définitivement perdue. Toutefois de récentes études ont montré que contrairement à ce que l'on pensait initialement, les cardiomyocytes possèdent un potentiel prolifératif (Bergmann, Bhardwaj et al. 2009, Bersell, Arab et al. 2009, Kajstura, Gurusamy et al. 2010, Kajstura, Urbanek et al. 2010) et qu'en réponse à un stress tel que l'infarctus, des cardiomyocytes préexistants sont capables de se diviser pour remplacer les cellules mortes (Senyo, Steinhauser et al. 2013). Cependant, le remplacement des cardiomyocytes morts en réponse à un stress est un phénomène dont l'importance est limitée puisque le turn-over estimé est très faible et de l'ordre de 0.76% par an. Dans une situation physiologique, chez un individu sain, le taux de mort cellulaire des cardiomyocytes est considéré comme très faible (entre 1 et 11 cellules mortes pour  $10^5$  cellules selon les auteurs (Olivetti, Abbi et al. 1997, Guerra, Leri et al. 1999, Saraste, Pulkki et al. 1999)). Chez l'homme atteint d'insuffisance cardiaque, ainsi que dans plusieurs modèles animaux de pathologies cardiaques tels que la constriction de l'aorte transverse ou l'hyperstimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, une augmentation faible mais significative de la mort cellulaire des cardiomyocytes a été observé (80 à 237 cellules mortes pour  $10^5$  cellules pour des patients

atteints d'insuffisance cardiaque (Olivetti, Abbi et al. 1997, Guerra, Leri et al. 1999, Saraste, Pulkki et al. 1999)).

Parmi les différents types de mort cellulaire pouvant coexister au sein d'un organisme, l'apoptose et la nécrose sont actuellement considérées comme prédominantes chez les cardiomyocytes.

L'apoptose, décrite pour la première fois par Kerr, Wyllie et Currie en 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972), est caractérisée par une perte de contact avec les cellules voisines, la rétraction des pseudopodes, la réduction du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, puis la fragmentation de la cellule en « corps apoptotiques » (figure 17). *In vivo*, les corps apoptotiques sont reconnus *via* l'exposition des phosphatidylsérines (Fadok, Voelker et al. 1992) puis éliminées par les macrophages, les cellules épithéliales ou les fibroblastes. Au cours du processus apoptotique, contrairement à la nécrose, l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue, ce qui empêche le déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et limite le déclenchement d'une réaction inflammatoire.



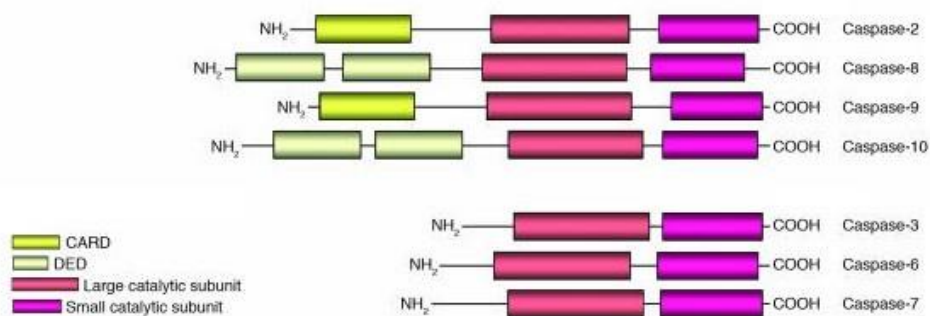
**Figure 17. Changements morphologiques associés à la mort cellulaire par apoptose.**

Sur la gauche, schéma de l'évolution morphologique de la cellule au cours du processus apoptotique (d'après (Cohen 1993)). Sur la droite, photographie de microscopie électronique à balayage permettant de visualiser les bourgeonnements des cellules apoptotiques (David McCarthy/Science Photo Library).

Parmi les différents acteurs du processus apoptotique, nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux caspases, protéines exécutrices de l'apoptose et aux membres de la famille Bcl2, qui régulent ce processus de mort.

## 1. Les caspases

Les caspases forment une famille d'endoprotéases dont la caractéristique commune est la présence d'un site catalytique composé d'un résidu cystéine (Cys285) qui permet aux caspases de reconnaître et de cliver sélectivement leurs protéines cibles, à une ou plusieurs positions de la chaîne polypeptidique, du côté C-terminal du résidu aspartate (Stennicke and Salvesen 1999). La spécificité de reconnaissance de chacune des caspases pour leurs substrats est assurée par un motif tétrapeptidique situé en amont du site de clivage. Les caspases sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives appelées zymogènes ou pro-caspases. Les caspases peuvent s'autoactiver ou être activées par d'autres caspases par clivage, permettant l'élimination du prodomaine et la libération de la petite et de la grande sous-unité, qui s'assemblent alors en un hétérodimère. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont regroupées en deux catégories en fonction de la longueur et de la séquence primaire du pro-domaine N-terminal (Philchenkov 2004). On distingue les caspases à pro-domaine long (> 90 acides aminés) appelées caspases initiatrices (-2, -8, -9, -10) et les caspases à pro-domaine court (< 30 acides aminés) appelées caspases exécutrices, ou effectrices, (-3, -6 et -7) activées par clivage par les caspases initiatrices (ou exécutrices en boucle de rétro-amplification) (figure 18).



**Figure 18. Caspases impliquées dans l'apoptose.** Les caspases-2, -8, -9 et -10 ont un long pro-domaine, ce sont des caspases initiatrices. Les caspases-3, -6 et -7 ont un pro-domaine court, ce sont des caspases exécutrices (Lavrik, Golks et al. 2005).

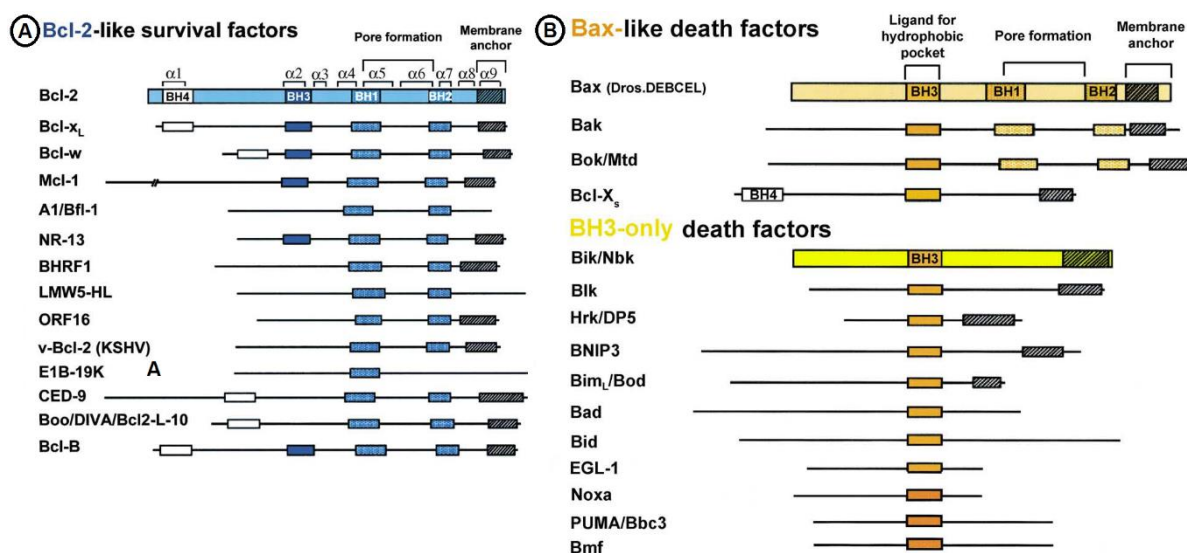
Lorsque les caspases exécutrices sont activées, elles clivent leurs protéines cibles au sein de la cellule, ce qui aboutit selon les cas, soit à l'activation de protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose, soit à l'inactivation de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire. L'activité des caspases est sujette à une régulation par différentes protéines anti-apoptotiques telles que FLIP (FLICE-like Inhibitory Protein), un homologue

inactif de la procaspase-8, et les IAPs (Inhibitors of Apoptosis), qui constituent une famille d'inhibiteurs dont les cibles principales sont les caspases -3, -7 et -9.

## 2. La famille Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend des membres pro-apoptotiques comme les protéines Bax, Bak et Bid et des membres anti-apoptotiques dont fait partie Bcl-2, le membre fondateur de cette famille (pour revue (Antonsson 2004)). Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent des domaines d'homologie (Bcl-2 Homology, BH1 à 4) qui permettent leur interaction. Elles sont regroupées en trois catégories : (figure 19, pour revues (Kelekar and Thompson 1998, Chipuk, Moldoveanu et al. 2010))

- les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>
- les protéines pro-apoptotiques qui comportent les domaines BH1 à BH3, telles que Bak et Bax
- les protéines pro-apoptotiques ne possédant qu'un seul domaine BH3, appelées BH3-only, telles que Bad, Bid, Noxa ou Puma, et considérées comme des activateurs de Bax et Bak.

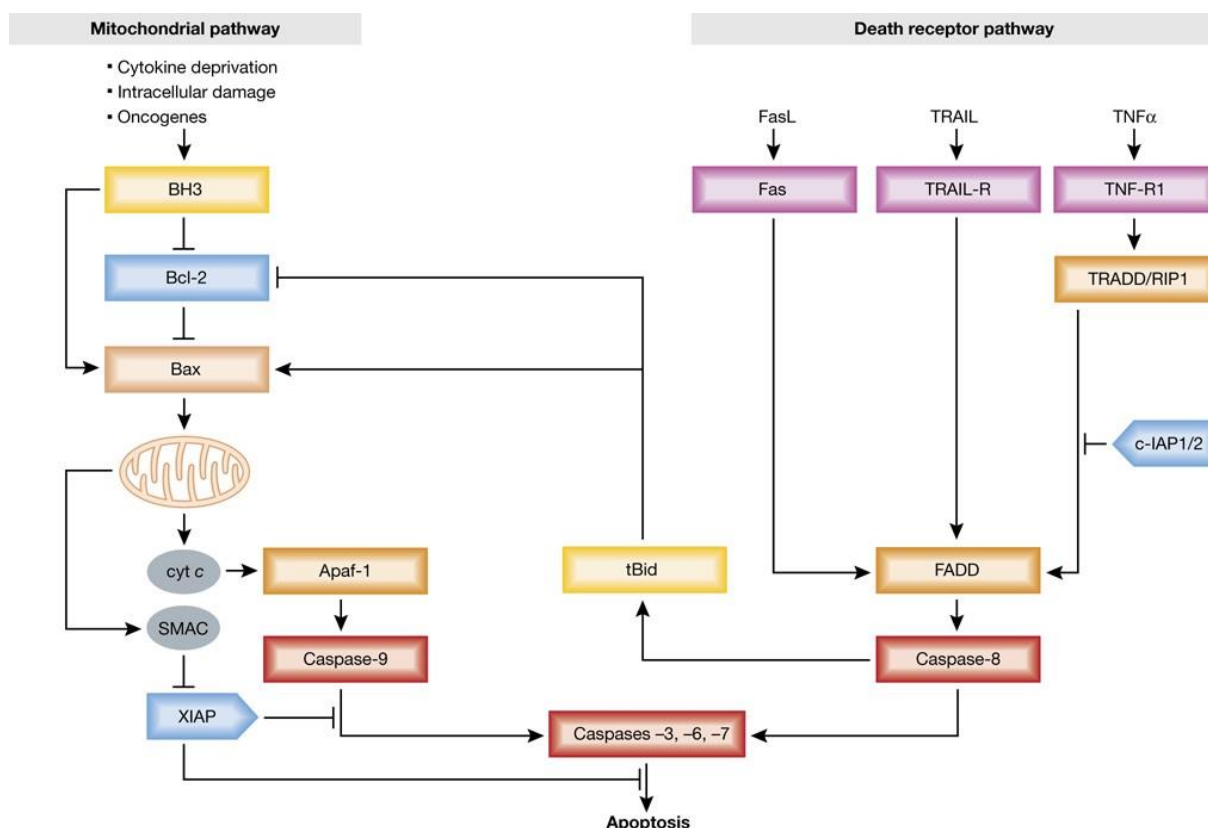


**Figure 19. Classification des membres de la famille Bcl-2.** Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en deux sous-groupes : les anti-apoptotiques (A) et les pro-apoptotiques (B). Ces dernières sont classées en deux catégories : les protéines à plusieurs domaines (BH1, BH2 et BH3) comme Bax, et les protéines BH3-only (Borner 2003).

Les protéines de la famille Bcl-2 étant capables de former des homo-oligomères ou des hétérodimères entre elles, le mode d'action décrit le plus simple consiste en une inactivation des protéines par hétérodimérisation entre des membres pro- et anti-apoptotiques (Lucken-Ardjomande and Martinou 2005). Ainsi, les membres en excès conservent leur effet sur la régulation de l'apoptose et les autres sont inhibés. Certaines de ces protéines, comme Bcl-2 (Nguyen, Millar et al. 1993), possèdent un signal de localisation à la mitochondrie, tandis que d'autres, comme Bax, font constamment des allers-retours entre le cytoplasme et la mitochondrie en conditions physiologiques (Edlich, Banerjee et al. 2011). En ce qui concerne l'effet intrinsèque de chaque protéine, il n'y a pas de mode d'action univoque à tout un groupe, mais on sait que directement ou indirectement les protéines des trois catégories agissent sur la perméabilisation d'une ou des membranes mitochondriales. Plusieurs de ces protéines, incluant Bax et Bcl-2, ont également été retrouvées dans la membranes du RE et participent à la régulation de la communication apoptotique entre cet organe et la mitochondrie en réponse au un stress RE (Sharaf El Dein, Gallerne et al. 2009).

### **3. La voie mitochondriale de l'apoptose**

Chez les Mammifères, le processus apoptotique conduisant à l'activation des caspases, peut emprunter deux voies majeures de signalisation : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort), initialisée à la surface cellulaire, et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) qui fait intervenir la mitochondrie (figure 20). La voie extrinsèque est déclenchée par la liaison de ligands extracellulaires sur leurs récepteurs membranaires spécifiques, appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et au NGF (Nerve Growth Factor). La voie mitochondriale est initiée en réponse à différents stimuli tels que les altérations irréversibles de l'ADN, l'activation d'oncogènes, le stress oxydatif ou encore le stress RE.



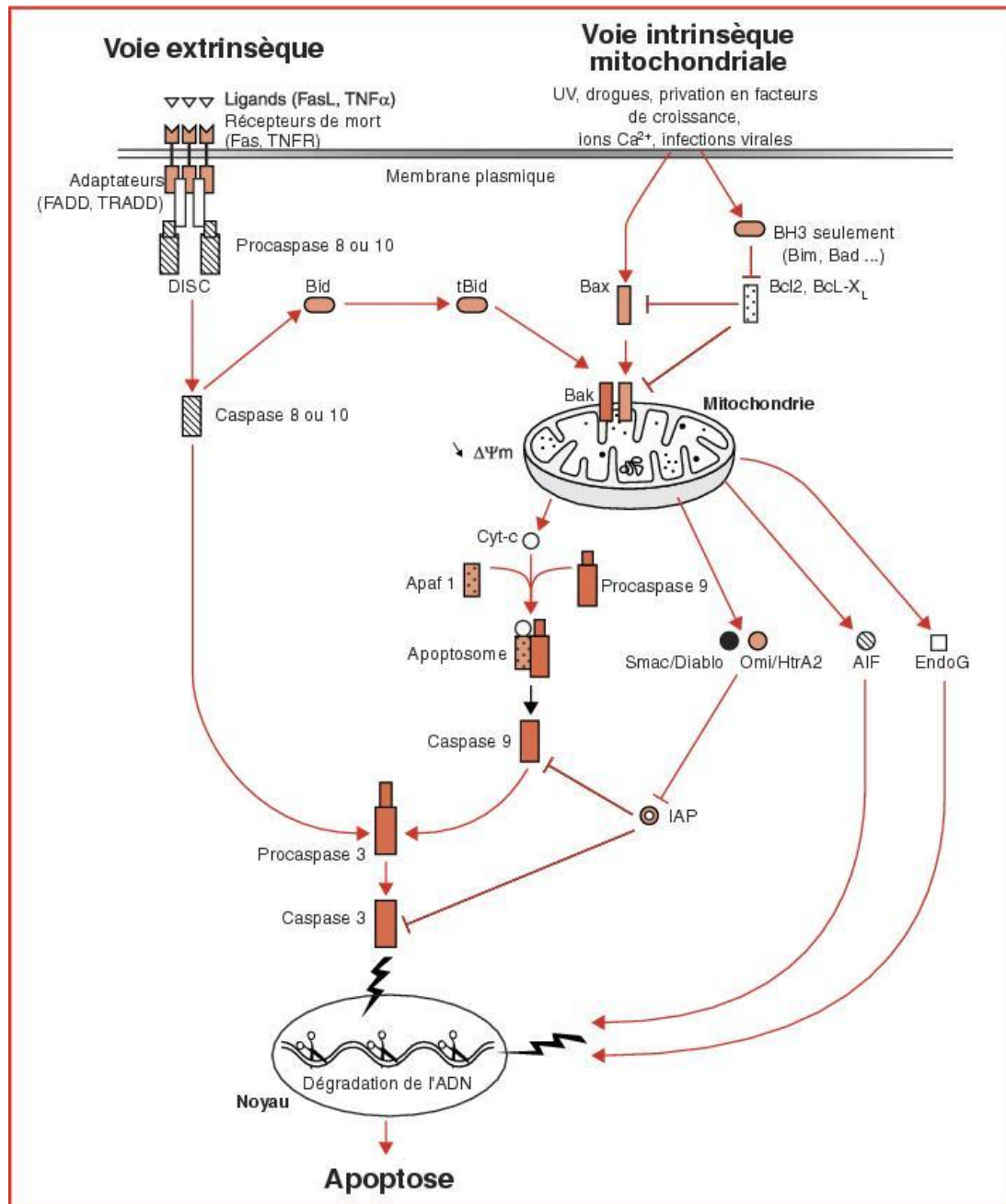
**Figure 20. Les deux voies principales d'activation de l'apoptose.**

La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) est déclenchée par les membres de la famille des récepteurs au TNF à la surface cellulaire. Le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (et TRADD dans certains cas) entraîne l'activation de la caspase-8, qui active les caspases effectrices -3, -6 et -7. La caspase-8 peut aussi cliver la protéine pro-apoptotique Bid en tBid (truncated Bid) qui active la voie mitochondriale régulée par Bcl-2. L'activation de la voie mitochondriale (voie intrinsèque), se traduit par la perméabilisation des membranes mitochondriales et le recrutement de la protéine adaptatrice Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1), de la caspase-9 et du cytochrome c pour former l'apoptosome, en présence d'ATP. L'apoptosome active la caspase-9 (initiatrice) qui peut ensuite activer les caspases effectrices. Les IAP (inhibitors of apoptosis) inhibent les caspases-3 et -7 mais cette inhibition est elle-même bloquée par le facteur Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding protein with Low pI) relargué par la mitochondrie lors de sa perméabilisation (Strasser, Cory et al. 2011).

L'implication de la mitochondrie dans le processus apoptotique a été mise en évidence pour la première fois en 1994 par Vayssière et coll. qui ont démontré que la chute du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et l'altération de l'activité mitochondriale constituaient des événements précoces de l'apoptose (Vayssiere, Petit et al. 1994). Ces

travaux, ont depuis été confirmés dans de nombreux modèles cellulaires (pour revue (Kroemer, Galluzzi et al. 2007)). Bien que les détails moléculaires de l'activation de la voie mitochondriale soient encore sujets à controverse, il est largement admis que cette activation conduit à la perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM), à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et au relargage, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, de protéines pro-apoptotiques (Patterson, Spahr et al. 2000) comme le cytochrome c (Liu, Kim et al. 1996), l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) (Susin, Lorenzo et al. 1999), l'Endonuclease G (EndoG) (Li, Luo et al. 2001), la sérine protéase HtrA2/Omi (High temperature requirement protein A2/ Omi stress-regulated endoprotease) (Suzuki, Imai et al. 2001) et Smac/DIABLO (Du, Fang et al. 2000, Verhagen, Ekert et al. 2000)(figure 21). Les protéines relarguées initient alors la cascade protéolytique des caspases ou la fragmentation de l'ADN, aboutissant au démantèlement de la cellule (pour revue : (Kroemer, Galluzzi et al. 2007)).





**Figure 21. Voie intrinsèque de l'apoptose.**

L'activation de la voie mitochondriale s'accompagne de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (contrôlée par les membres de la famille Bcl-2) et/ou de la perméabilisation des membranes interne et externe en réponse à l'ouverture du PTP et entraîne la chute du potentiel membranaire et le relargage de protéines situées dans l'espace intermembranaire vers le cytosol. Parmi ces protéines, le cytochrome c s'associe à Apaf1 et à l'ATP, formant l'apoptosome qui permet l'activation de la procaspase-9 puis des caspases-3, -6 et -7. L'apoptose indépendante des caspases repose le relargage d'AIF ou d'EndoG qui migrent au noyau pour fragmenter l'ADN (Blondel 2006).

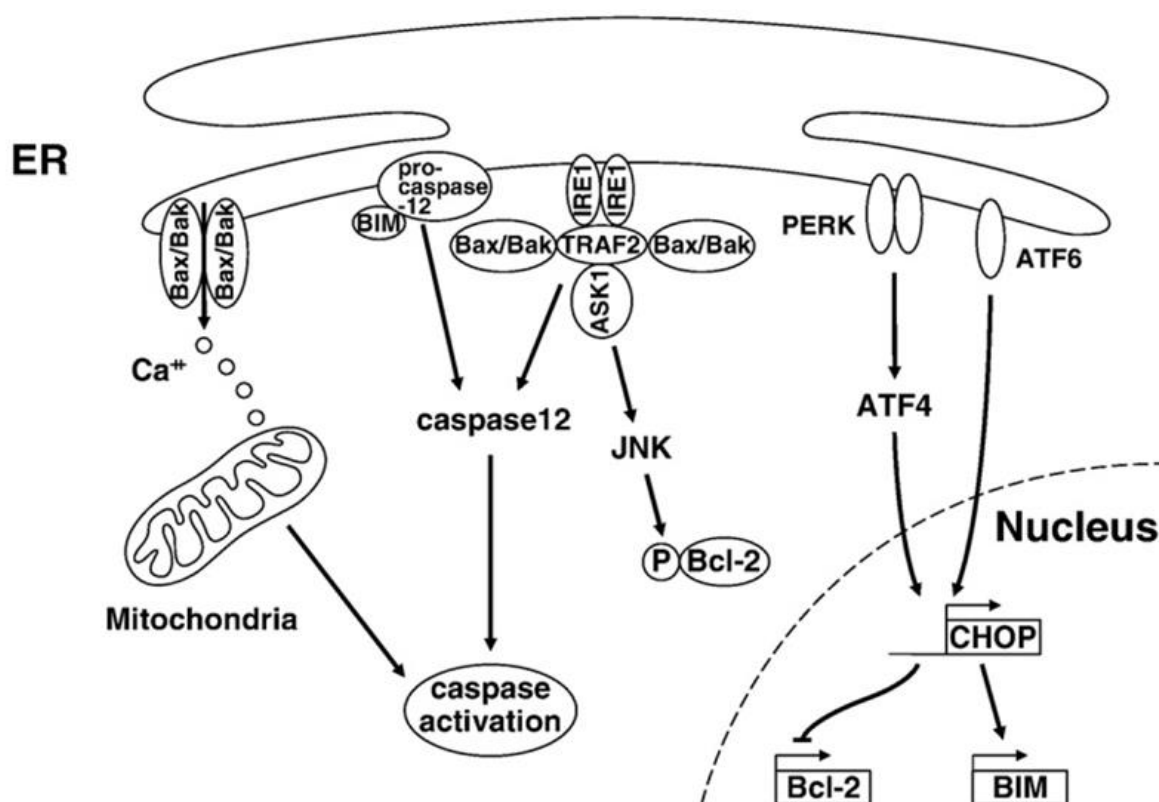


Une fois relargué, le cytochrome c se fixe à la protéine adaptatrice cytosolique Apaf-1, ce qui provoque un changement de conformation de cette protéine et son oligomérisation de façon dépendante de l'ATP. Apaf-1 interagit alors avec la procaspase-9 pour former un complexe multiprotéique nommé apoptosome (pour revue (Bratton and Salvesen 2010)). Ce complexe provoque l'activation par autoprotéolyse de la caspase-9, ce qui induit l'activation en cascade des caspases exécutrices -3 et/ou -7 et de ce fait, conduit à la dégradation des différents composants de la cellule (Bao and Shi 2007). Le relargage des protéines Smac/DIABLO et HtrA2/Omi entraîne l'inhibition des IAP, par séquestration dans le cas de Smac/DIABLO (Ho, Li et al. 2007), ou par dégradation dans le cas de HtrA2/Omi (Verhagen, Ekert et al. 2000, Hegde, Srinivasula et al. 2002) et entraîne entre autres, l'activation de caspase-9 ou -3. En parallèle de ces mécanismes, il existe dans la voie intrinsèque une seconde voie indépendante des caspases impliquant l'EndoG et l'AIF qui transloquent vers le noyau (figure 21). L'EndoG est une endonucléase qui coopère avec AIF pour dégrader l'ADN (Li, Luo et al. 2001), tandis que L'AIF est une flavoprotéine impliquée dans la condensation de la chromatine.

Actuellement, deux modèles principaux de PMM sont décrits : le premier repose sur une perméabilisation de la membrane externe, notamment *via* la formation d'oligomères des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, et le second est basé sur la perméabilisation des deux membranes *via* l'ouverture prolongée du pore de transition de perméabilité (PTP) (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). A ce jour, la composition exacte du PTP est toujours sujette à controverse. Initialement, ce canal était considéré comme un complexe constitué de VDAC (sur la membrane externe), de l'ANT (sur la membrane interne) et de la cyclophiline D (dans la matrice mitochondriale), dont l'activité serait régulée par plusieurs protéines régulatrices (Brenner and Grimm 2006) Cependant, il a été démontré dans des modèles génétiques de délétions des différents isoformes de VDAC et de l'ANT, que la fonctionnalité du pore est conservée, remettant en question la composition du PTP. La cyclophiline D est la seule protéine nécessaire à la fonctionnalité du pore et est donc le seul membre dont l'implication dans la régulation de l'ouverture du PTP est admise. Récemment d'autres hypothèses ont été proposées sur la nature de ce complexe, notamment par l'équipe de Paolo Bernardi qui a suggéré que le PTP serait formé de dimères de l'ATP synthase (Giorgio, von Stockum et al. 2013).

## C. Stress RE, réponse UPR et apoptose

Même si la réponse UPR a pour but initial d'activer des mécanismes adaptatifs permettant un retour à l'homéostasie, en cas de stress RE excessif ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la voie mitochondriale de l'apoptose est activée, ce qui permet l'élimination de la cellule pour limiter les dommages à l'organisme. La figure 22 présente certains des liens connus entre stress RE, voie UPR et mécanismes de déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose.



**Figure 22. Stress RE, réponse UPR et apoptose.**

IRE1 interagit avec la protéine adaptatrice TRAF2 et ASK1, ce qui entraîne la phosphorylation de JNK. Ce dernier favorise l'apoptose par phosphorylation et inhibition de Bcl-2. CHOP réprime l'expression de Bcl-2 et active celle de Bim ainsi que sa localisation au RE. Bak et Bax, dans la membrane du RE, s'oligomérisent et permettent un relargage de calcium dans le cytosol, ce qui active les voies mitochondriales de l'apoptose, dépendante et indépendante des caspases. D'après (Minamino and Kitakaze 2010).

Même si les mécanismes moléculaires responsables du « switch » de la réponse adaptative à la réponse apoptotique en réponse au stress RE sont encore mal connus, les protéines clés de la réponse UPR ont été impliquées dans le déclenchement de cette mort cellulaire (Szegezdi, Logue et al. 2006).

### **1. Branche PERK et apoptose**

L'activation de la kinase PERK conduit à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  qui induit l'expression d'ATF3 et d'ATF4 permettant à leur tour l'expression du facteur CHOP, le principal membre de la voie UPR impliqué dans l'apoptose en réponse au stress RE (Oyadomari and Mori 2004). Ce facteur de transcription active l'apoptose dans différents systèmes, en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough, Martindale et al. 2001) et en activant celle de la protéine pro-apoptotique Bim (pour revue (Tsai and Weissman 2010)), du récepteur de mort DR5 (death Receptor 5 ; (Yamaguchi and Wang 2004)) et de TRB3 (Tribbles Homolog 3 ; (Ohoka, Yoshii et al. 2005)).

### **2. Branche IRE1 et apoptose**

La branche IRE1 contribue également à l'apoptose induite par un stress RE prolongé en activant la voie TRAF2/JNK (TNF Receptor-Associated Factor 2/c-Jun N-terminal protein Kinase) qui entraîne l'inhibition de Bcl-2 par phosphorylation (Urano, Wang et al. 2000). De plus, il a été démontré récemment que la stimulation de l'activité RNase d'IRE1 induirait la dégradation par clivage de plusieurs MiRs impliqués dans la répression de l'expression de la caspase-2 (tels que MiR -17, -34a, -96, et -125b), ce qui induirait une augmentation du niveau d'expression de cette caspase et activerait la voie mitochondriale de l'apoptose (Upton, Wang et al. 2012). La branche IRE1, en permettant la production du facteur de transcription XBP1s, permet également l'expression du facteur pro-apoptotique (Oyadomari and Mori 2004).

### **3. Branche ATF6 et apoptose**

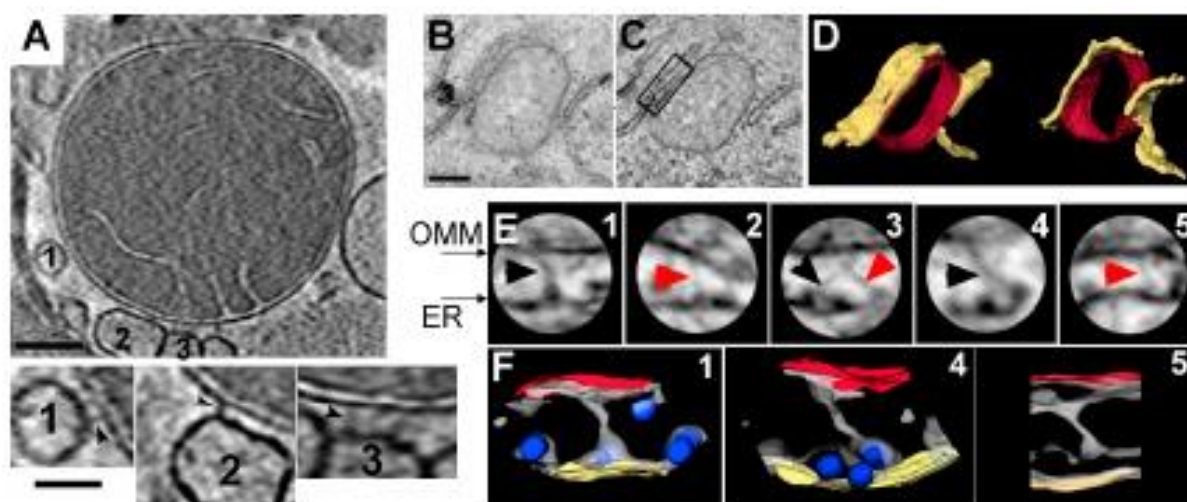
En réponse à un stress RE sévère, la branche ATF6 contribue au déclenchement de l'apoptose en augmentant l'expression de la protéine pro-apoptotique WBP1 (WW domain Binding Protein) et la réduction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (induced Myeloid Leukemia Cell differentiation), membre de la famille Bcl-2 (Morishima, Nakanishi et al. 2011). ATF6 induit également l'apoptose en activant directement l'expression de CHOP (Gotoh, Oyadomari et al. 2002).

#### 4. Caspase 12 et apoptose

Outre les protéines de la réponse UPR, il a été mis en évidence chez les rongeurs, l'existence de la caspase-12, localisée sur la face cytosolique de la membrane du RE, qui serait activée spécifiquement en réponse au stress RE par les calpaïnes (protéases à cystéine dépendantes du calcium) en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakagawa and Yuan 2000) ou par la voie de signalisation dépendante de IRE1 (Yoneda, Imaizumi et al. 2001). Une fois activée par clivage, la caspase-12 active la cascade protéolytique des caspases et l'apoptose (Morishima, Nakanishi et al. 2002, Rao, Castro-Obregon et al. 2002). Néanmoins, d'autres travaux ont mis en évidence dans des cellules de carcinome et de mélanome murins, que l'absence de caspase-12 n'empêche pas la mort des cellules induite par le stress RE (Jimbo, Fujita et al. 2003, Kalai, Lamkanfi et al. 2003), suggérant ainsi que la caspase-12 ne serait pas indispensable au processus apoptotique induit par un stress RE. Chez l'homme, la caspase 12 est présente sous une forme non fonctionnelle et il a été suggéré que la caspase 4 pourrait remplacer la caspase 12 dans l'apoptose induite par un stress RE (Hitomi, Katayama et al. 2004).

#### 5. Calcium, pore de transition de perméabilité mitochondriale et apoptose

Plusieurs études ont permis de montrer que RE et les mitochondries forment un réseau dynamique à l'intérieur duquel ils coopèrent pour synthétiser des protéines mitochondriales et des phospholipides, contrôler l'homéostasie calcique et réguler la mort cellulaire (pour revue (Sharaf El Dein, Gallerne et al. 2009)). Bien que le RE et la mitochondrie soient des organites distincts, de nombreux travaux montrent de manière claire l'existence d'interactions locales entre ces deux compartiments cellulaires. Les interactions entre le RE et la mitochondrie ont été mises en évidence par des expériences de cosédimentation, de microscopie électronique et confocale et plus récemment par tomographie électronique (Csordas, Thomas et al. 1999). Ces travaux montrent que les liens physiques entre le RE et les mitochondries sont de nature protéique et ont une longueur de ~10 nm au niveau du REL et de ~25 nm au niveau du RER (figure 23).



**Figure 23. Liaisons physiques entre le RE et la mitochondrie visualisées par tomographie électronique.**

(A) Tomogramme d'une coupe de mitochondrie (700 nm de diamètre) de foie de rat, permettant de visualiser de nombreux liens physiques (flèches) avec des vésicules de RE (1, 2 et 3). (B) Photographie de microscopie électronique et (C) de tomographie électronique de cellules montrant une juxtaposition RE/mitochondrie. (D) Modélisation informatique de la surface du RE (jaune) et de la membrane externe mitochondriale (rouge). (E) Tomogrammes à plus fort grossissement des régions d'interface RE/mitochondrie permettant de visualiser des liaisons impliquant les ribosomes (flèches). (F) Modélisation tridimensionnelle des tomogrammes permettant d'exposer les liens physiques (en gris) entre la membrane externe mitochondriale (en rouge), le RE (en jaune) et les ribosomes (en bleu) (Csordas, Thomas et al. 1999).

Ces liens protéiques permettent la juxtaposition étroite des deux organites, ce qui génère des microenvironnements appelés microdomaines ou MAM (mitochondria associated membranes) qui favorisent les échanges, en particulier les flux calciques, entre le RE et les mitochondries (Rizzuto, Pinton et al. 1998). Le rapprochement RE/mitochondrie est permis grâce à la motilité de ces organelles, rendue possible par les microtubules (Friedman, Webster et al. 2010). En réponse au stress RE, le nombre de points de contact entre ces deux organelles est augmenté, ce qui favorise les échanges et en particulier les transferts calciques. Dans un premier temps, ces transferts de calcium du RE vers la mitochondrie stimulent la respiration mitochondriale (Bravo, Vicencio et al. 2011), mais s'ils sont trop importants ou maintenus sur une durée prolongée, ils déclenchent la voie mitochondriale de l'apoptose. En effet, en réponse au stress RE, l'ouverture prolongée de l'IP3R ou du RYR, entraîne une accumulation massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale qui conduit à l'ouverture du PTP, à la

perméabilisation des membranes mitochondriales et à l'apoptose (Zoratti and Szabo 1995, Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). De manière intéressante, l'inhibition ou l'invalidation de la cyclophiline D, membre du PTP, qui est cardioprotective dans un modèle d'infarctus (Argaud, Gateau-Roesch et al. 2005, Baines, Kaiser et al. 2005, Argaud, Loufouat et al. 2008) a été associée à une diminution des transferts calciques entre le RE et la mitochondrie et au déclenchement d'un stress RE protecteur (Belaidi, Decorps et al. 2013). Le rôle des MAM dépend donc du contexte et suivant l'intensité ou la durée du stress subit, les échanges entre les deux organites vont être protecteurs et permettre à la cellule de s'adapter ou au contraire induire l'apoptose.

## IV. Le stress RE dans les pathologies cardiaques

Alors que le stress RE est associé depuis plus de 20 ans aux pathologies telles que le diabète, les maladies neurodégénératives ou encore à certains cancers, son étude dans le domaine des maladies cardiovasculaires est relativement récente puisque la première publication date de 2004 (Okada, Minamino et al. 2004). Cette étude démontre que le stress RE est activé dans un modèle de surcharge de pression induite par une constriction de l'aorte transverse (TAC) chez la souris. Après une semaine de TAC, l'hypertrophie, qui témoigne du remodelage du myocarde, est associée à une augmentation de l'expression de différents marqueurs de stress RE tels que GRP78 et GRP94. A ce stade, l'apoptose n'est pas déclenchée et la fonction cardiaque est préservée. Après 4 semaines, l'hypertrophie devient plus importante, le facteur pro-apoptotique de la réponse au stress RE, CHOP est fortement exprimé, l'apoptose est déclenchée, et la fraction d'éjection est diminuée, témoignant de la transition du stade compensé vers un stade pathologique. Ces travaux sont les premiers à avoir suggéré un lien entre le stress RE et le développement de la pathologie cardiaque. Depuis, de nombreuses études ont démontré l'implication du stress RE dans la majorité des pathologies et modèles de pathologies cardiaques. Tout d'abord, chez la souris, une mutation du récepteur KDEL, impliqué dans le contrôle qualité des protéines, induit un stress RE dans tout l'organisme. Néanmoins, le principal phénotype observé dans ce modèle est une cardiomyopathie dilatée, soulignant la sensibilité du cœur au stress RE (Hamada, Suzuki et al. 2004). Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le cochon d'inde, le stress RE est activé et conduit à l'apoptose, ce qui contribue au développement de la pathologie (Xin, Li et al. 2011). La mort cellulaire induite par l'ischémie est également associée au stress RE (Szegezdi, Duffy et al. 2006). De même, une cardiomyopathie développée par des rats



diabétiques (Li, Zhang et al. 2008, Takada, Miki et al. 2012) ainsi que les cardiomyopathies alcooliques et auto-immunes ont été associées à une augmentation de l'expression de marqueurs de stress RE et à l'apoptose (Mao, Fukuoka et al. 2007, Cai 2008). Dans un modèle d'arythmie liée à une mutation des canaux de type HERG, un stress RE est déclenché et semble impliqué dans la pathologie (Keller, Platoshyn et al. 2005). Une hyperstimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques chez le rat et la souris, modèle connu pour induire une dysfonction cardiaque, est également associé à un stress RE (Chen, Zhang et al. 2011, Ayala, Montenegro et al. 2012, Zhuo, Wu et al. 2013). Enfin, la cardiotoxicité associée à l'utilisation de drogues anti-cancéreuses telles que l'imatinib mesylate (Kerkela, Grazette et al. 2006), la doxorubicine (Wang, Yang et al. 2012) ou le cisplatine (Ma, Jones et al. 2010), est également lié au stress RE et à l'apoptose des cellules cardiaques, soulignant à nouveau la sensibilité du cœur au stress RE.

Chez l'homme plusieurs études ont également confirmé l'implication du stress RE dans les pathologies cardiaques. En effet chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée, l'expression de GRP78 et du facteur XBP1s, deux membres clés de la voie UPR, est augmentée (Dally, Monceau et al. 2009). De plus, chez des patients ayant subi un infarctus, il a été observé dans les cardiomyocytes proches de la zone infarctée, une augmentation de l'expression de PDI, un autre marqueur du stress RE (Severino, Campioni et al. 2007).

L'implication du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques est aujourd'hui admise et il apparaît qu'un stress RE modéré serait bénéfique en déclenchant des réponses adaptatives, alors qu'un stress RE plus important provoquerait l'apoptose des cardiomyocytes et aggraverait la dysfonction cardiaque.

## A. Stress RE délétère et pathologies cardiaques

L'apoptose déclenchée par un stress RE important semble particulièrement délétère pour la fonction cardiaque. Il a ainsi été suggéré qu'une inhibition de la réponse au stress RE pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour protéger le myocarde. En faveur de cette hypothèse, il a été démontré que des souris invalidées pour le facteur pro-apoptotique CHOP développent une hypertrophie moins importante et que leur fonction cardiaque est préservée par rapport aux souris sauvages en réponse à une surcharge de pression (Fu, Okada et al. 2010). Ces mêmes souris sont également protégées de la mort cellulaire, de l'inflammation et du stress oxydant induits dans un modèle d'ischémie reperfusion (Miyazaki, Kaikita et al. 2011). De plus, un traitement par des chaperonnes chimiques telles que l'acide

Tauroursodeoxycholique (TUDCA) ou le sodium 4-phenyl-butyrate (PBA), qui limitent le stress RE, diminue l'apoptose, l'hypertrophie et limite la perturbation de la fonction cardiaque induite par l'ischémie (Ceylan-Isik, Sreejayan et al. 2011, Ayala, Montenegro et al. 2012, Park, Cha et al. 2012) ou par un régime riche en acides gras (Turdi, Hu et al. 2013). Par ailleurs, le salubrinal, une molécule décrite comme inhibant la branche PERK de la voie UPR, protège les rats de la dysfonction cardiaque induite par surcharge de pression ou par hyper stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Dalal, Foster et al. 2012, Liu, Wang et al. 2014). Enfin, le post-conditionnement qui consiste en une réoxygénation progressive du cœur après une phase d'ischémie, et qui est connu pour protéger de la mort cellulaire déclenchée lors de la réoxygénation complète, est associé à une diminution du stress RE (Liu, Zhang et al. 2008, Dong, Teng et al. 2010, Gan, Hu et al. 2012).

Le rôle bénéfique des  $\beta$ -bloquants dans l'insuffisance cardiaque a également été associé à une inhibition du stress RE. En effet, un traitement avec du metoprolol, un  $\beta$ -bloquant sélectif des récepteur  $\beta$ -1, dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le chien, limite les altérations de la fonction cardiaque et diminue l'expression de marqueurs de stress RE (George, Sabbah et al. 2011). De plus, la dysfonction cardiaque induite par l'isoprénaline (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) ou une constriction de l'aorte transverse est protégée par un traitement avec un  $\beta$ -bloquant (metoprolol ou propranolol) et cette protection est associée à une diminution du stress RE (Ni, Zhou et al. 2011). En complément de ces publications, un nombre important de molécules cardioprotectrices ont très récemment été associées à une inhibition du stress RE et sont listées dans le tableau 1.



Molécule	Modèle	Référence
Atorvastatin	Infarctus du myocarde (rat)	(Song, Yang et al. 2011)
Kaempferol	Ischémie/reperfusion (rat)	(Kim, Ha et al. 2008)
Darbepoetin	Cardiomyopathie auto-immune (lapin)	(Mao, Iwai et al. 2008)
Telmisartan	Constriction de l'aorte abdominale (rat)	(Guan, Shangguan et al. 2011)
Valsartan	Cardiomyopathie diabétique (rat)	(Wu, Dong et al. 2011)
Klotho	Hyperstimulation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques (isoproterenol) (souris)	(Song, Gao et al. 2013)
Panax quinquefolius	Infarctus du myocarde (rat)	(Xue, Liu et al. 2013)
Corydalis tuber	Infarctus du myocarde (rat)	(Xue, Liu et al. 2013)
Pravastatin	Constriction de l'aorte transverse (souris)	(Zhao, Liao et al. 2008)
sulfide d'hydrogène	Hyperhomocystéinémie (rat)	(Wei, Zhang et al. 2010)
Fasudil	Ischémie/reperfusion (rat)	(Li, Zhu et al. 2012)
Icariin	Tunicamycine (H9c2)	(Zhang, Li et al. 2013)
O-GlcNAc	Ischémie/reperfusion et Tunicamycine (Cardiomyocytes néonataux de rat)	(Ngoh, Hamid et al. 2009)
Salusins	Infarctus du myocarde (rat)	(Wang, Wang et al. 2012)
Baicalin	Tunicamycine (Cardiomyocytes néonataux de rat)	(Shen, Wang et al. 2014)
Salubrinal	Hypoxie et tunicamycine (Cardiomyocytes néonataux de rat), ligation de l'artère coronaire (rat)	(Liu, Li et al. 2012, Liu, Wang et al. 2014)
Exendin 4	Hyperglycémie (Cardiomyocytes néonataux de rat)	(Younce, Burmeister et al. 2013)
Argirein	Streptozotocin (rat)	(Shi, Cheng et al. 2013)
Apelin	Régime riche en graisses (souris)	(Ceylan-Isik, Kandadi et al. 2013)
CYP2J2	Isoprotérénol et angiotensine II (souris)	(Wang, Ni et al. 2014)
5-Methoxytryptophan	Ischémie reperfusion (rat)	(Chou and Chan 2014)
Ursolic acid	Choc thermique (souris)	(Yang, Li et al. 2014)

**Tableau 1 : Molécules dont les effets cardioprotecteurs sont liés à une diminution du stress RE.** Dans l'ensemble de ces modèles, la dysfonction cardiaque est associée au stress RE et à l'apoptose. Toutes les molécules listées limitent l'augmentation des marqueurs de stress RE, protègent de l'apoptose et préservent la fonction cardiaque.

## B. Stress RE bénéfique et pathologies cardiaques

En opposition avec les différents travaux mentionnés ci-dessus, d'autres études ont suggéré que non seulement l'inhibition de la réponse au stress RE ne serait pas bénéfique mais au contraire qu'elle augmenterait l'atteinte cardiaque. Par exemple, il a été démontré qu'un pré-conditionnement, consistant en plusieurs courtes périodes d'ischémie, connu pour préparer les cardiomyocytes et les protéger des dommages et de la mort cellulaire induits par une phase d'ischémie plus longue, a été associé à un stress RE jouant un rôle protecteur. En effet, le pré-conditionnement limite la mort cellulaire lors de la réoxygénation et induit un stress RE modéré qui conduit à l'activation de p38 MAPK et à l'augmentation de l'expression de la calréticuline. Dans ces conditions, l'inhibition de la réponse au stress RE diminue l'augmentation de l'expression de la calréticuline et bloque les effets protecteurs induits par l'ischémie-reperfusion (Zhu, Liu et al. 2006). Il a également été mis en évidence que la protection de souris invalidées pour la cyclophiline D contre les atteintes cardiaques induites par l'ischémie-reperfusion est associée à un stress RE bénéfique et que l'inhibition de ce stress RE lève la protection des cardiomyocytes (Belaidi, Decorps et al. 2013). D'autres parts, en réponse à l'hypoxie, l'invalidation de XBP1 ou d'ATF6 bloque l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes induite par un stress RE ce qui augmente la mort cellulaire (Thuerauf, Marcinko et al. 2006, Doroudgar, Thuerauf et al. 2009). Enfin, les publications ayant suggéré que les effets bénéfiques du post-conditionnement seraient liés à un blocage du stress RE (cf paragraphe précédent) ont été remises en cause par une étude qui suggère au contraire que le post-conditionnement permet l'activation de la réponse UPR et l'induction de protéines chaperonnes jouant un rôle protecteur (Natarajan, Salloum et al. 2009, Xu, Liu et al. 2009).

Le rôle adaptatif et bénéfique du stress RE dans la protection contre le développement des pathologies cardiaques semble être lié en particulier à une augmentation de l'expression de protéines chaperonnes. En effet, en réponse à l'ischémie-reperfusion, la branche ATF6 de la voie UPR est activée et induit l'augmentation importante de l'expression de protéines chaperonnes cardioprotectrices telles que PDIA6, GRP78 et GRP94 (Vekich, Belmont et al. 2012). Des souris qui surexpriment de manière inductible une forme active d'ATF6 présentent une augmentation plus importante de l'expression de ces chaperonnes en réponse à l'ischémie-reperfusion et sont protégées de la mort cellulaire (Martindale, Fernandez et al. 2006). De plus, l'extinction de GRP78, la protéine chaperonne clé de la réponse au stress RE, augmente l'atteinte cardiaque induite par l'ischémie (Shintani-Ishida, Nakajima et al. 2006,

Alcendor, Gao et al. 2007), alors que l'augmentation pharmacologique ou moléculaire de son expression protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire (Pan, Lin et al. 2004, Zhang, Lun et al. 2004, Fu, Minamino et al. 2008). Dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par une surcharge de pression (TAC), la surexpression de PDI, une chaperonne régulée par la voie UPR, est cardioprotectrice et protège de la dysfonction cardiaque. Enfin, chez des patients ayant subi un infarctus, il a été observé dans les cardiomyocytes proches de la zone infarctée que l'augmentation de l'expression de PDI est inversement proportionnelle à l'apoptose (Severino, Campioni et al. 2007).

En conclusion, l'ensemble de ces études a permis de démontrer l'importance du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques. Ce stress RE peut être dans certains cas bénéfique et s'opposer au développement de la pathologie et dans d'autres cas délétères et favoriser le développement de la maladie. Ces résultats, qui ont dans un premier temps pu paraître contradictoires, ont permis l'émergence des notions de stress RE adaptatif dans le cadre d'un stress RE modéré et de stress RE délétère lorsque le stress RE est intense ou prolongé. Dans ce contexte, l'inhibition des réponses délétères induites par le stress RE (telles que l'expression du facteur CHOP) ou l'activation des réponses adaptatives (telles que l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes) protège le cœur et limite le développement de la pathologie. Ainsi, l'objectif actuel des recherches sur le stress RE en physiopathologie cardiaque vise non pas à inhiber la réponse au stress RE mais plutôt à la moduler, de manière à conserver les réponses adaptatives bénéfiques tout en limitant la survenue de l'apoptose délétère. Il apparaît donc important de mieux comprendre les mécanismes de la réponse UPR et d'identifier de nouveaux acteurs de la régulation du stress RE dans le cardiomyocyte. Au cours de mes travaux de thèse, je me suis en particulier intéressé à la déacétylase SIRT1 et à sa capacité à moduler la réponse des cardiomyocytes au stress RE.

## **Chapitre IV : SIRTUINE 1**

### **I. La famille des sirtuines**

#### **A. Historique**

SIR2, le premier gène de la famille des sirtuines a été découvert chez la levure *S.cerevisiae* en 1979 par Klar et al. (Klar, Fogel et al. 1979) et fut d'abord appelé MAR1 (pour Mating-type Regulator 1). Ce gène a été identifié en étudiant des mutations spontanées causant la stérilité et entraînant une levée de l'inhibition de certains loci de type HMR et HML situés à proximité de télomères. Ces travaux ont été complétés par la découverte d'autres mutations entraînant également la stérilité et l'ensemble de cette famille de gènes a été renommés SIR (1-4) pour Silent Information Regulator (Rine and Herskowitz 1987).

Sir2 est devenue la cible de nombreux de projets de recherche suite à un article publié en 2000 dans Science par l'équipe de L. Guarente qui montre que chez la levure, les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité sont dépendants de Sir2 $\alpha$  (Lin, Defossez et al. 2000). La restriction calorique est la méthode la plus efficace pour accroître la longévité de différents organismes dont des mammifères tels que le rongeur (Swindell 2012) et le primate (Colman, Anderson et al. 2009, Colman, Beasley et al. 2014). La nécessité de Sir2 $\alpha$  dans ce processus a donc permis l'élaboration de l'hypothèse selon laquelle Sir2 $\alpha$  serait une cible, qui en étant activée de manière pharmacologique, pourrait reproduire les effets de la restriction calorique sur la longévité. L'engouement pour Sir2 $\alpha$  était né, de nombreux groupes de recherches se sont alors intéressés aux sirtuines.

#### **B. Les différents isoformes de la famille des sirtuines**

Chez les mammifères, la famille des sirtuines comprend sept membres (SIRT1 à 7, pour revue voir (Michan and Sinclair 2007)). Ces isoformes ont en commun une séquence conservée de 275 acides aminés correspondant au domaine portant l'activité catalytique. Les domaines N et C terminaux sont de longueurs et de séquences variables conférant aux sirtuines différentes fonctions et différentes localisations cellulaires (tableau 2). Ainsi, SIRT1 et SIRT2 ont été localisées dans le cytoplasme, SIRT6 et SIRT7 dans le noyau et SIRT3, SIRT4 et SIRT5 dans la mitochondrie. Ces différents isoformes ont des activités enzymatiques de déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 et SIRT7) et de mono-ADP ribosyl transferase (SIRT2, SIRT3, SIRT4 et SIRT6). Récemment, des

activités enzymatiques de dessuccinylase, de demalonylase et de deglutarylase ont également été attribuées à SIRT5.

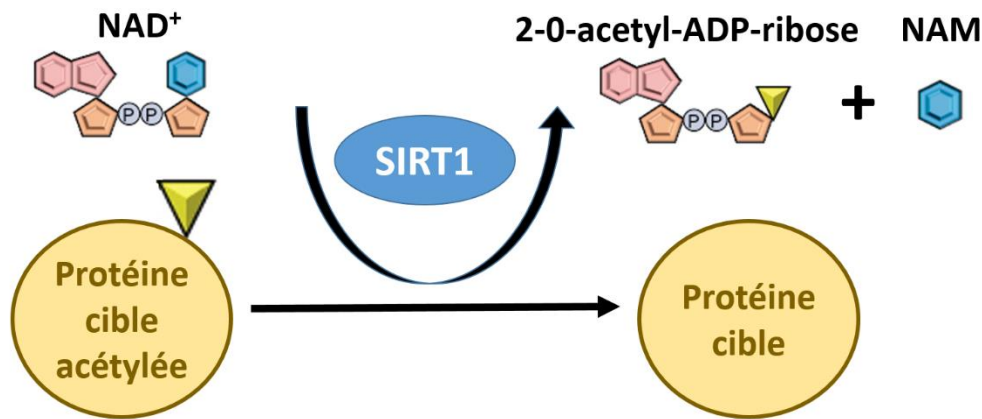
Dans différents types cellulaires et notamment dans les cardiomyocytes, SIRT1 a été localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Nasrin, Kaushik et al. 2009, Tanno, Kuno et al. 2010, Tong, Morrison et al. 2013), la translocation entre ces deux compartiments étant régulée par des modifications post-traductionnelles qui seront détaillées dans la suite de ce manuscrit. Par ailleurs, il a été montré dans des cellules Hela, que cette déacétylase pouvait être localisée dans la mitochondrie et être associée à PGC-1 $\alpha$ , Tfam et à l'ADN mitochondrial, participant ainsi directement à l'expression des protéines codées par le génome mitochondrial et à la biogénèse mitochondriale (Aquilano, Vigilanza et al. 2010). Bien que cette localisation de SIRT1 ait été également observée dans des cellules neuronales (Thompson, Dave et al. 2013), la présence de SIRT1 dans la mitochondrie est encore sujette à controverse, car d'autres études n'ont pas permis de détecter SIRT1 dans la fraction mitochondriale de cellules musculaires (Gurd, Yoshida et al. 2011).

### C. Activité de la sirtuine 1

Au cours de ma thèse je me suis plus particulièrement intéressé à SIRT1 et à son activité de déacétylase. SIRT1 est une déacétylase de type III, elle a donc besoin du cofacteur NAD<sup>+</sup> pour fonctionner. Comme le montre la figure 24, SIRT1 catalyse le transfert du groupement acétyl d'une protéine au NAD<sup>+</sup>, produisant ainsi du 2-O-acétyl-ADP-ribose et du nicotinamide (NAM). Cette déacétylation qui a lieu sur un résidu lysine est une modification post-traductionnelle qui va avoir pour conséquence l'augmentation ou l'inhibition de l'activité de la protéine ainsi modifiée. SIRT1 a d'abord été considérée comme une histone déacétylase (Imai, Armstrong et al. 2000), mais en 2001, p53, une cible non-histone de SIRT1 a été découverte (Vaziri, Dessain et al. 2001). Depuis, de nombreuses protéines cibles non-histones incluant entre autres p53, PGC-1 $\alpha$  ou encore FOXO, ont été découvertes comme étant déacétylées par cette sirtuine.

Nom	Localisation	Activité enzymatique	Principaux processus	Références
<b>SIRT1</b>	Cytoplasme Noyau	Deacetylase	métabolisme, biogénèse et fonction mitochondriale, réponse au stress oxydant, autophagie, apoptose, inflammation, stabilité du génome, réparation des dommages à l'ADN	(Haigis and Sinclair 2010)
<b>SIRT2</b>	Cytoplasme	Deacetylase monoADP- rybosyl- transferase	Nécrose programmée, prolifération, stabilité du génome	(Kim, Vassilopoulos et al. 2011, Newton, Hildebrand et al. 2014, Wu, Song et al. 2014)
<b>SIRT3</b>	Mitochondrie	Deacetylase monoADP- rybosyl- transferase	Biogénèse, dynamique et métabolisme mitochondrial, réponse au stress oxydant	(Bause, Matsui et al. 2013, Rato, Duarte et al. 2014, Samant, Zhang et al. 2014)
<b>SIRT4</b>	Mitochondrie	monoADP- rybosyl- transferase	Réparation des dommages à l'ADN, métabolisme des acides gras, métabolisme mitochondrial, réponse à l'hypoxie	(Laurent, de Boer et al. 2013, Liu, Che et al. 2013, Acs, Bori et al. 2014)
<b>SIRT5</b>	Mitochondrie	Deacetylase dessuccinylase demalonylase deglutarylase	Métabolisme mitochondrial, biogénèse mitochondriale, protection contre les espèces réactives de l'oxygène.	(Lin, Xu et al. 2013, Liu, Che et al. 2013, Buler, Aatsinki et al. 2014)
<b>SIRT6</b>	Noyau	Deacetylase monoADP- rybosyl- transferase	Stabilité du génome et des télomères, expression du génome, réparation des dommages à l'ADN	(Beauharnois, Bolivar et al. 2013)
<b>SIRT7</b>	Noyau	Deacetylase	Synthèse d'ARNt et d'ARNr, biogénèse des ribosomes, prolifération, morphologie de la chromatine	(Paredes, Villanova et al. 2014)

**Tableau 2: Localisations, activités enzymatiques et principales fonctions des différentes sirtuines**



**Figure 24 :** Représentation schématique d'une réaction de déacétylation catalysée par *SIRT1*. *SIRT1* catalyse le transfert d'un groupement acétyl d'une protéine au  $\text{NAD}^+$  produisant ainsi du 2-O-acetyl-ADP-ribose et du nicotinamide (NAM).

## II. Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1

### A. Régulation de l'expression de SIRT1

#### 1. Régulation de la transcription de SIRT1

Un nombre importants de protéines régulent directement l'expression de SIRT1 en se fixant sur son promoteur. Ces facteurs de transcriptions sont listés dans le tableau 3. Parmi ces facteurs nous pouvons citer ATF4, dont l'expression est augmentée en réponse au stress RE, et p53 activée en réponse au stress génotoxique. FOXO et PPAR $\alpha$  sont impliqués dans l'augmentation de la longévité induite par la restriction calorique en stimulant l'expression de SIRT1. De manière intéressante il a également été démontré qu'une augmentation de la disponibilité en  $\text{NAD}^+$ , en plus d'augmenter l'activité enzymatique de SIRT1, permet également d'augmenter son expression (Rogina and Helfand 2004, Rodgers, Lerin et al. 2005). Un mécanisme expliquant cette activation transcriptionnelle de SIRT1 a été proposé par Zhang et al. en 2007 (Zhang, Wang et al. 2007). CtBP, une protéine nucléaire régulée par le  $\text{NAD}^+$  (pour revue, voir (Chinnadurai 2002)), est un corepresseur transcriptionnel qui s'associe avec le répresseur transcriptionnel HIC1 se fixant sur le promoteur de SIRT1 (Chen, Wang et al. 2005). Lorsque le niveau de  $\text{NAD}^+$  augmente, l'interaction CtBP/HIC1 est réduite, HIC1 libère le promoteur de SIRT1 et la transcription de cette sirtuine est augmentée.



Protéine	Modèle étudié	Régulation SIRT1	Rôle physiologique	Référence
FoxM1	Gliome	↑	Bloque l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire	(Zhu, Shi et al. 2014)
CLOCK/BMAL1	Hépatocyte	↑	Protège des altérations du métabolisme lié à un trouble des rythmes circadiens	(Zhou, Zhang et al. 2014)
APE1 hOGG1 Ku70	Carcinome cervical	↑	Protège des dommages à l'ADN en réponse à un stress oxydant	(Antoniali, Lirussi et al. 2014)
NFκB	Cancer rénal	↑	Protège de l'apoptose en réponse à l'inflammation	(Katto, Engel et al. 2013)
ATF4	Cancer de l'estomac	↑	Protège de l'apoptose	(Zhu, Xia et al. 2012)
p53	Cellules d'estomac de singe	↑	Protège de l'apoptose et des dommages à l'ADN	(Chen, Wang et al. 2005)
E2F1	Cancer de poumons	↑	Protège de l'apoptose et des dommages à l'ADN	(Wang, Chen et al. 2006)
Nkx2.5	Cardiomyocytes	↑	Protège de l'apoptose en réponse à un traitement à la doxorubicine	(Zheng, Lu et al. 2013)
c-Myc	Cellules rénales et MEF	↑	Inhibe la tumorigénèse	(Yuan, Minter-Dykhouse et al. 2009)
FOXO	Carcinome cervicale	↑	Augmente l'expression de SIRT1 en réponse à la restriction calorique	(Nemoto, Fergusson et al. 2004)
HIC1	Fibroblastes embryonnaire de souris	↓	Protège de l'apoptose induite par HIC1 et p53 en réponse aux dommages à l'ADN	(Chen, Wang et al. 2005)
PPARα	Hépatocytes	↑	L'augmentation de l'expression de SIRT1 par PPARα participe aux effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité	(Hayashida, Arimoto et al. 2010)
Sp1	Hépatocytes	↑	Augmente l'expression de SIRT1 en réponse à la restriction calorique	(Okazaki, Iwasaki et al. 2010)
PPARγ	Carcinome cervical	↓	PPARγ est augmentée au cours du vieillissement et participe à la sénescence en diminuant l'expression de SIRT1	(Han, Zhou et al. 2010)

**Tableau 3 : Protéines modulant positivement ou négativement la transcription de SIRT1**

## 2. Régulation de la stabilité de l'ARNm de SIRT1

Un nombre important de Micro ARN a été identifiés dans différents modèles comme étant capables de se lier à l'ARNm de SIRT1 et d'en limiter la traduction. Le tableau 4 présente de manière non exhaustive les principaux MiRs qui ont été impliqués dans la régulation de l'ARNm de SIRT1.

Micro ARN	Modèle étudié	Rôle physiologique	Référence
MiR 217	Cellules endothéliales	L'inhibition transcriptionnelle de SIRT1 est nécessaire pour déclencher l'angiogenèse	(Zhang, Liu et al. 2013)
MiR 199a-5p	Souris et cardiomyocytes	L'augmentation de l'expression de SIRT1 pendant l'ischémie est associée à la diminution du Mir 199a-5p	(Rane, He et al. 2009)
MiR 204	Cellules de cancer gastriques	MiR204 est diminué dans le cancer, ce qui permet l'augmentation de l'expression de SIRT1, la prolifération et la résistance à la mort cellulaire	(Zhang, Wang et al. 2013)
MiR 29c	Cellules de carcinome de foie	MiR29c est diminué dans le cancer, ce qui permet l'augmentation de l'expression de SIRT1, la prolifération et la résistance à la mort cellulaire. Un taux faible de MiR29c est associé à un mauvais diagnostic chez les patients atteints de cancer du foie	(Bae, Noh et al. 2013)
MiR142	Culture primaire de neurones	MiR142 est augmenté dans plusieurs pathologies neurodégénératives, ce qui diminue l'expression de SIRT1 et limite les neurotransmissions dopaminergiques	(Chaudhuri, Yelamanchili et al. 2013)
MiR 34a	Cellules de cancer de colon	La surexpression du MiR34a diminue l'expression de SIRT1 et induit l'apoptose	(Yamakuchi, Ferlito et al. 2008)
MiR 146b	3T3-L1	L'inhibition du MiR146b augmente l'expression de SIRT1 et inhibe la formation d'adipocytes	(Ahn, Lee et al. 2013)
MiR 126	Cellules de cancer des os	MiR126 est diminué dans des cellules de cancer des os. Une surexpression de ce MiR limite la prolifération cellulaire	(Xu, Liu et al. 2013)
MiR 138	Neurones	Une diminution de MiR138 induit l'augmentation de l'expression de SIRT1 nécessaire pour la croissance des axones	(Liu, Wang et al. 2013)
MiR 195	Cellules endothéliales	L'augmentation de l'expression du MiR195 par un traitement au glucose inhibe l'expression de SIRT1 et est impliquée dans la rétinopathie induite par le glucose	(Mortuza, Feng et al. 2014)

**Tableau 4: Micro ARN impliqués dans la régulation de l'expression de SIRT1**

Récemment un ARN non codant appelé Sirt1 AS lncRNA a été découvert comme pouvant se lier à l'ARNm de SIRT1, ce qui limite l'inhibition de sa traduction par le MiR 34a. Cet ARN stimule ainsi l'augmentation de l'expression de SIRT1 dans un modèle de cellules musculaires C2C12 (Wang, Pang et al. 2014). L'expression de SIRT1 est également régulée par HuR, une protéine connue pour se fixer sur des ARNm et pour en réguler la stabilité. De manière intéressante, un stress oxydant entraîne une dissociation de l'ARNm de SIRT1 et de HuR (suite à la phosphorylation de HuR par Chk2), réduisant ainsi la stabilité de cet ARNm, ce qui diminue l'expression de SIRT1 (Abdelmohsen, Pullmann et al. 2007). Enfin, une étude très récente a montré l'existence d'un épissage alternatif du pré-ARNm de SIRT1. Cet épissage permettant la traduction d'un autre isoforme de SIRT1 dépourvue de l'exon 8. (Zhao, Zhao et al. 2014).

### 3. Régulation de la stabilité de la protéine SIRT1

Une étude a démontré que l'augmentation de l'expression de SIRT1 en réponse à la restriction calorique dans des cellules cancéreuses n'est pas liée à une augmentation de la transcription de SIRT1, mais plutôt à une augmentation de la stabilité de la protéine, en limitant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Han, Zhao et al. 2014). De plus, il a été démontré que les cœurs de rats âgés subissent un stress oxydatif plus important en réponse à l'ischémie-reperfusion. Cette sensibilité serait liée à une diminution de l'activité de SIRT1 en réponse à sa carbonylation induite par le stress oxydant (Gu, Xing et al. 2013).

## B. Régulation de l'activité de SIRT1

### 1. Régulation de l'activité de SIRT1 par la disponibilité en NAD<sup>+</sup>

La nécessité du NAD<sup>+</sup> pour l'activité de SIRT1, associée à un Km élevé (estimé à environ 150-200μM, (Smith, Hallows et al. 2009)), fait de la disponibilité de ce cofacteur une étape clé dans la régulation de SIRT1 (Imai, Armstrong et al. 2000, Landry, Slama et al. 2000, Lin, Defossez et al. 2000). Ainsi, une augmentation importante de l'activité de SIRT1 est observée lorsque des cellules en culture ou des souris sont traitées avec du nicotinamide riboside (NR) qui est rapidement transformé en NAD<sup>+</sup>, notamment par les kinases de la famille NRK (Nicotinamide Ribosides Kinases) (Bieganowski and Brenner 2004, Canto, Houtkooper et al. 2012). Par ailleurs, la diminution de l'expression de protéines

consommatrices de  $\text{NAD}^+$ , telles que PARP-1 ou CD38, induit une augmentation du  $\text{NAD}^+$  disponible et stimule l'activité de SIRT1 (Bai, Canto et al. 2011). A l'inverse, le produit des réactions de déacétylations des protéines, le nicotinamide (NAM), est un puissant inhibiteur de SIRT1 (Landry, Slama et al. 2000, Anderson, Bitterman et al. 2003). Une stimulation de la Nampt (Nicotinamide phosphoribosyltransferase), enzyme impliquée dans la synthèse du  $\text{NAD}^+$  à partir du NAM, induit une augmentation importante de l'activité de SIRT1 en augmentant le taux de  $\text{NAD}^+$  dans la cellule, alors qu'une délétion de cette enzyme diminue l'activité de SIRT1 (Wang, Hasan et al. 2011).

Dans une situation de stress comme la restriction calorique ou l'activité physique, l'accumulation du  $\text{NAD}^+$  active SIRT1, ce qui stimule la biogénèse mitochondriale et permet de faire face à la demande énergétique importante induite par le stress. De plus, lors de ces stress, le rapport ATP/AMP diminue, ce qui augmente l'activité de l'AMPK (AMP activated Kinase). Une fois activée, cette kinase induit l'augmentation de l'expression de la Nampt, ce qui stimule la resynthèse de  $\text{NAD}^+$  et donc l'activité de SIRT1 (Fulco, Cen et al. 2008). La forte activation de SIRT1 en réponse à un stress métabolique, fait donc de cette déacétylase un senseur métabolique permettant l'adaptation des capacités de productions énergétiques en fonction de la consommation et des besoins énergétiques de la cellule (pour revue, voir (Houtkooper, Canto et al. 2010)).

## 2. Régulation de l'activité de SIRT1 par modification post-traductionnelle

### a. Régulation par phosphorylation

En réponse à différents type de stress, tels qu'un stress génotoxique, un stress oxydant ou encore une perturbation de l'homéostasie calcique, SIRT1 est phosphorylée sur plusieurs résidus, parmi lesquels on peut citer Thr522, Thr530, Ser27, Ser47, Ser154, Ser434, Ser540, Ser649, Ser651, Ser659, Ser661 et Ser683. Ces phosphorylations sont régulées par différentes kinases dont neuf ont été identifiées à ce jour : JNK1 (Nasrin, Kaushik et al. 2009), PKA (Gerhart-Hines, Dominy et al. 2011), CK2 (Kang, Jung et al. 2009), mTOR ((Back, Rezvani et al. 2011), DYRK1A et DYRK3 (Guo, Williams et al. 2010), cyclinB/Cdk1 (Sasaki, Maier et al. 2008), CDK5 (Bai, Liang et al. 2012) et CAMKII ( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II (Wen, Chen et al. 2013)).

Le rôle de ces phosphorylations n'est pas totalement élucidé, mais de manière générale, la phosphorylation de SIRT1 est considérée comme une modification entraînant une augmentation de son activité. Selon certains auteurs, l'activation de SIRT1 par

phosphorylation serait liée à une diminution de l'agrégation de cette protéine, limitante pour son activité (Guo, Williams et al. 2010). Dans d'autres études, cette phosphorylation est décrite comme régulatrice de la translocation de SIRT1 du cytoplasme vers le noyau. SIRT1 une fois phosphorylée serait adressée au noyau pour réguler l'activité de protéines nucléaires, notamment des facteurs de transcription et des histones (Nasrin, Kaushik et al. 2009). Il a également été démontré que la phosphorylation de SIRT1 induit un changement conformationnel de la protéine, permettant une meilleure accessibilité aux substrats acétylés et une dissociation plus rapide des substrats déacétylés (Sasaki, Maier et al. 2008, Guo, Williams et al. 2010). Enfin, bien que la régulation directe de l'activité de SIRT1 par JNK2 ne soit pas encore démontrée, la délétion de JNK2 entraîne une diminution de la phosphorylation de SIRT1 sur le résidu Ser27, associée à une diminution de la demi-vie de SIRT1 (Ford, Ahmed et al. 2008). Il est également intéressant de mentionner qu'une phosphorylation maintenue sur une longue durée induit la dégradation de SIRT1 (Gao, Zhang et al. 2011).

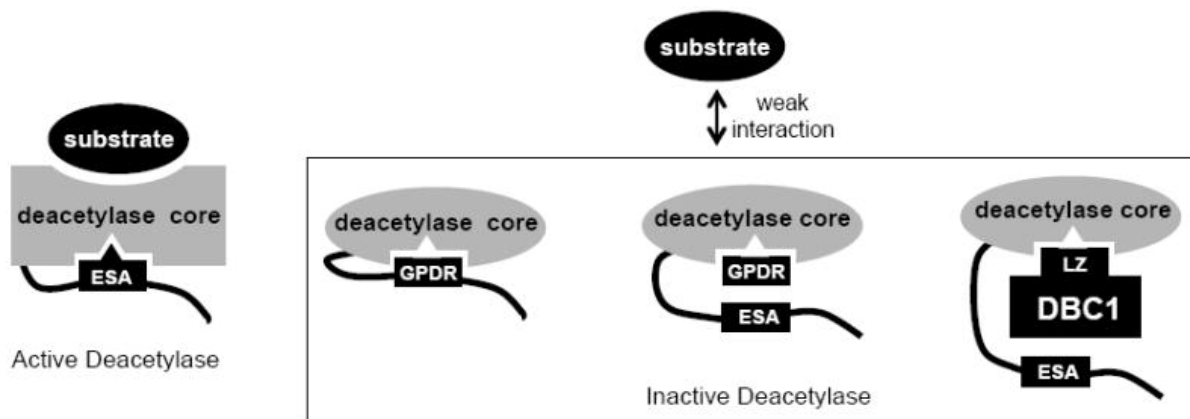
#### b. Régulation par nitrosylation, méthylation et sumoylation

En réponse à un stress induit par l'oxyde nitrique, GAPDH est nitrosylée, se lie à la protéine Siah1 et transloque dans le noyau où ce complexe nitrosyle SIRT1 sur les résidus Cys387 et Cys390, inhibant ainsi son activité (Kornberg, Sen et al. 2010). SIRT1 est également méthylée sur de nombreux résidus lysines (Lys233, 235, 236, 238). Cette méthylation est régulée par la méthyltransferase Set7/9, est augmentée lors de dommages à l'ADN et inhibe l'activité de SIRT1 (Liu, Wang et al. 2011). D'autres études ont également montré que SIRT1 est sumoylée sur le résidu lysine 734 et désomoylée par la désomoylase nucléaire SENP1. Cette sumoylation permettrait de maintenir SIRT1 dans le noyau et d'augmenter son activité transcriptionnelle. Une activation de la sumoylase SENP1 induite par un stress oxydant, entraîne une désomoylation responsable d'un défaut de translocation de SIRT1 dans le noyau et d'une diminution de l'activité de SIRT1 (Yang, Fu et al. 2007).

### 3. Régulation de l'activité de SIRT1 par interactions avec d'autres protéines

#### a. Régulation par DBC1

DBC1 pour Deleted in Breast Cancer 1 est une protéine récemment découverte qui comme son nom l'indique serait absente dans des cellules tumorales de cancer du sein. Cette protéine est capable de se fixer sur la partie catalytique de SIRT1 et d'inhiber son activité ((Kim, Chen et al. 2008, Zhao, Kruse et al. 2008). SIRT1 peut réguler par elle-même son activité par un changement conformationnel entraînant un rapprochement entre le domaine d'activité déacétylase et un domaine appelé ESA (Essential for SIRT1 Activity). L'inhibition induite par DBC1 serait liée à une limitation de l'interaction entre ces deux domaines (figure 25, (Kang, Suh et al. 2011)).



**Figure 25 : Représentation schématique de l'auto-régulation de l'activité de déacétylase de SIRT1 et présentation du rôle de DBC1 dans ce processus.** Le rapprochement du domaine ESA et du domaine portant l'activité catalytique stimule la déacétylation des substrats de SIRT1. La perturbation de ce rapprochement induit par une double mutation (GPDR pour Gly 644→Pro (G644P) and Asp 650→Arg (D650R)) inhibe la déacétylation des substrats de SIRT1. DBC1 se fixe au domaine portant l'activité de déacétylase de SIRT1 par le biais de son domaine LZ (Leucine Zipper) et bloque l'accès au domaine ESA. D'après (Kang, Suh et al. 2011).

Certains auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que différents mécanismes capables de réguler l'activité de SIRT1 permettraient en fait de limiter l'interaction SIRT1/DBC1 et ainsi de conserver son activité de déacétylase. Dans ce contexte, il a été démontré que l'AMPK, dont l'activation est connue pour stimuler SIRT1 régulerait l'interaction SIRT1/DBC1. L'activation de SIRT1 par l'AMPK serait donc liée à la dissociation de SIRT1 et de DBC1 (Nin, Escande et al. 2012).

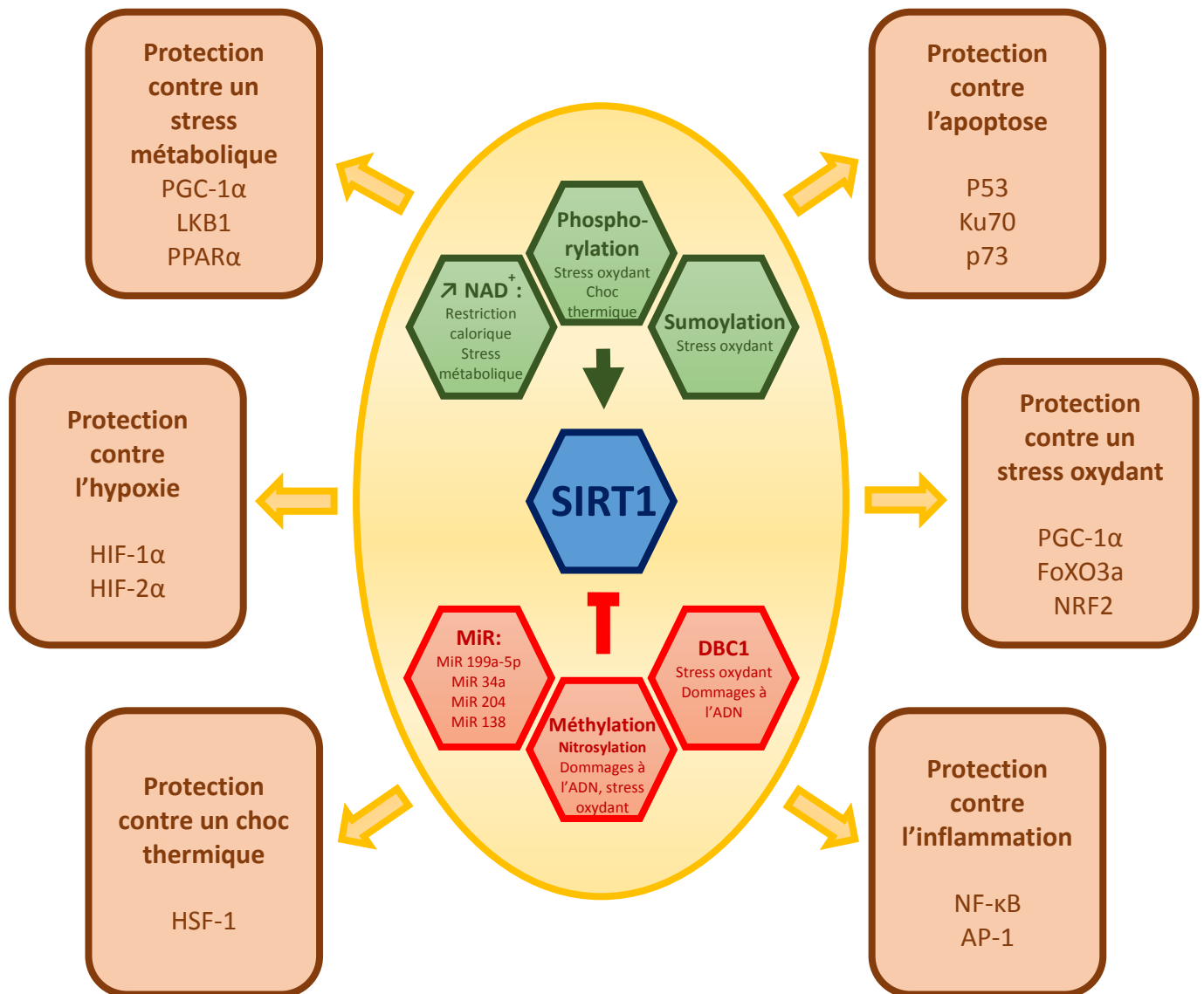
### b. Régulation par AROS

AROS (pour Active Regulator Of SIRT1) est une protéine nucléaire de 142 acides aminés dont la première fonction découverte en 2007 est d'activer SIRT1 (Kim, Kho et al. 2007). Une forme purifiée de cette protéine est en effet capable de se lier à SIRT1 et d'augmenter son activité de déacétylase. Une étude plus récente suggère qu'AROS module l'activité de SIRT1 de manière antagoniste à l'inhibition induite par DBC1 (Raynes, Pombier et al. 2013). Cependant, il a récemment été démontré qu'AROS joue également un rôle dans la survie de cellules cancéreuse de manière indépendante à son rôle sur l'activité de SIRT1 (Knight, Allison et al. 2013).

## **III. Les cibles de SIRT1**

L'étude intensive du rôle de SIRT1 (2784 articles ont été publiés sur SIRT1 depuis 1995), a permis la découverte de nombreuses protéines cibles de cette déacétylase, l'impliquant dans un grand nombre de processus cellulaires. Cependant, beaucoup de ces cibles ont été découvertes en utilisant le resveratrol, un activateur indirect et non spécifique de SIRT1. Dans ce chapitre j'ai donc choisi de faire une liste non exhaustive des principaux processus dans lesquels SIRT1 est impliqué en m'appuyant uniquement sur les travaux où la déacétylation de la cible de SIRT1 a été clairement démontrée.





*Figure 26 : Schéma récapitulatif de la régulation de SIRT1 et des principaux processus dans lesquels cette déacetylase est impliquée.*

### A. SIRT1 et le métabolisme énergétique

SIRT1 est considérée comme un senseur métabolique puisqu'en réponse à une diminution des rapports  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  et  $\text{ATP}/\text{AMP}$ , son activité est augmentée et permet de rétablir l'homéostasie de la cellule, notamment grâce à son action sur PGC-1α. SIRT1 en déacétylant PGC-1α, stimule l'activité des nombreux facteurs de transcription régulés par ce cofacteur transcriptionnel, parmi lesquels on peut citer PPARα, ERRα et NRF1 connus pour stimuler la biogénèse mitochondriale et l'utilisation des substrats énergétiques glycolytiques et lipidiques (Vega, Huss et al. 2000, Huss, Torra et al. 2004). SIRT1 déacétyle également LKB1 une kinase qui stimule l'activité de l'AMPK (Lan, Cacicedo et al. 2008),

protéine clé de la régulation du métabolisme énergétique qui phosphoryle et stimule l'activité de PGC-1 $\alpha$ , inhibe la synthèse des protéines et des lipides et favorise l'oxydation du glucose et des acides gras (pour revue voir (Russo, Russo et al. 2013)). De manière intéressante, il a récemment été proposé que des produits de la réaction de déacétylation catalysée par SIRT1 pourraient jouer un rôle important dans les processus régulés par cette sirtuine. En effet, le NAM produit par SIRT1 pourrait être méthylé et ainsi réguler la longévité chez *C. elegans* indépendamment de SIRT1 (Schmeisser, Mansfeld et al. 2013). De plus le métabolite 1-O-acetyl ADP ribose, produit de manière spécifique lors de la déacétylation d'un substrat par SIRT1, pourrait moduler l'activité de certaines protéines et limiterait l'accumulation d'acides gras dans les hépatocytes en condition pathologique (Pazienza, Borghesan et al. 2014). De plus, SIRT1 participe également aux régulations du métabolisme liées aux rythmes circadiens en déacétylant BMAL1/CLOCK (Nakahata, Kaluzova et al. 2008).

## B. SIRT1 et les défenses anti-oxydantes

A ce jour, la régulation de l'activité de SIRT1 en réponse au stress oxydant est encore sujette à controverse. En effet, alors que certains auteurs démontrent que le stress oxydant diminue l'activité de SIRT1 (Yang, Fu et al. 2007, Gu, Xing et al. 2013), d'autres auteurs suggèrent que le stress oxydant induit une augmentation de l'expression de SIRT1 (Kim, Nguyen et al. 2007, Prozorovski, Schulze-Topphoff et al. 2008). Quoi qu'il en soit, de par son action sur NRF2 (Kawai, Garduno et al. 2011), sur FoXO3a (Brunet, Sweeney et al. 2004) et sur PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 protège du stress oxydant en stimulant l'expression d'enzymes impliquées dans les défenses anti-oxydantes telles que la MnSOD et la catalase (pour revue, voir (Radak, Zhao et al. 2013)). Il a en outre été démontré que la deacetylation de FoXO3a ou de PGC-1 $\alpha$  favorise la formation d'un complexe entre ces deux protéines et que ce complexe est nécessaire pour la stimulation des défenses anti-oxydantes (Olmos, Sanchez-Gomez et al. 2013).

## C. SIRT1 et l'apoptose

La première cible non-histone de SIRT1 découverte en 2001 est p53 (Vaziri, Dessain et al. 2001) dont la déacétylation par SIRT1 inhibe l'activité et limite le déclenchement de l'apoptose. Depuis, d'autres cibles ont été découvertes telles que Ku70 (Jeong, Juhn et al. 2007), FOXO (Brunet, Sweeney et al. 2004), Akt (Li, Chen et al. 2013), E2F1 (Wang, Chen

et al. 2006) ou encore p73 (Dai, Wang et al. 2007), dont la déacétylation, de manière similaire à celle de p53, inhibe l'apoptose. De plus, et de manière indirecte, SIRT1 protège de l'apoptose en stimulant des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, telles que XPA (Fan and Luo 2010), WRN (Li, Casta et al. 2008) ou NBS1 (Yuan and Seto 2007). Ainsi, en réponse à un stress, l'activation de SIRT1 est plutôt considérée comme protectrice vis-à-vis de l'apoptose.

## D. SIRT1 et l'hypoxie

SIRT1 déacétyle les deux principales protéines de réponse à l'hypoxie, HIF1 $\alpha$  (Lim, Lee et al. 2010) et HIF2 $\alpha$  (Dioum, Chen et al. 2009). Le rôle de ces déacétylations est pour l'instant controversé puisque dans certains modèles elles entraîneraient une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF1 $\alpha$  et de HIF2 $\alpha$ , alors que dans d'autres études elle favorise l'activation de ces deux protéines. Quoi qu'il en soit, le rôle de SIRT1 dans la réponse à l'hypoxie est considéré comme protecteur, puisqu'il stimule la résistance à la mort cellulaire et au stress oxydant (Gu, Xing et al. 2013).

## E. SIRT1 et la réponse au choc thermique

SIRT1 déacétyle et régule la protéine de réponse au choc thermique, HSF1. Ce facteur de transcription, une fois activé par un choc thermique, transloque dans le noyau et active la transcription de plusieurs protéines chaperonnes (telles que Hsp40, Hsp70 ou Hsp72) afin de limiter l'agrégation de protéines mal repliées. Ce mécanisme impliqué dans le vieillissement, le cancer ou encore le diabète est très étudié dans la mesure où l'augmentation de l'expression de ces protéines chaperonnes confère aux cellules une résistance à la mort cellulaire et un maintien de leurs fonctions physiologiques. La découverte démontrant que SIRT1 déacétyle HSF1 et augmente sa capacité à stimuler la transcription de protéines chaperonnes représente une avancée intéressante dans la compréhension du rôle de SIRT1 dans le vieillissement (Westerheide, Anckar et al. 2009).

## F. SIRT1 et l'inflammation

De nombreuses études ont démontrées que SIRT1 est impliquée dans l'inflammation et limite l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-6 (pour revue voir (Xie, Zhang et al. 2013)). En déacétylant des protéines telles que des histones mais

aussi les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (Yang, Zhang et al. 2012) et AP-1 (Zhang, Chen et al. 2010), SIRT1 limite la transcription de protéines pro-inflammatoires. Il est également admis que l'expression de SIRT1 est diminuée dans la plupart des pathologies inflammatoires et que l'activation de cette protéine pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante pour ce type de pathologies (Hubbard and Sinclair 2014).

## IV. Rôle de SIRT1 dans le cœur

### A. Rôle de SIRT1

Les premières études sur le rôle de SIRT1 dans le cœur sont relativement récentes puisque la première publication date de 2004. Cet article démontre que l'expression de SIRT1 est augmentée dans un modèle d'insuffisance cardiaque et joue un rôle protecteur en déacétylant p53 et en protégeant de l'apoptose (Alcendor, Kirshenbaum et al. 2004). Les études *in vivo* du rôle de SIRT1 dans le cœur ont été confrontées au problème lié à l'inactivation de SIRT1 qui induit de fortes perturbations développementales conduisant à la mort des nouveaux nés (Cheng, Mostoslavsky et al. 2003, McBurney, Yang et al. 2003, Sequeira, Boily et al. 2008). Plusieurs équipes ont alors travaillé sur des modèles murins d'inactivation rendus viables par croisement de plusieurs souches de souris (Boily, Seifert et al. 2008, Boily, He et al. 2009). Cependant, la mortalité au cours des premiers jours après la naissance dans ces lignées de souris invalidées pour SIRT1 est restée élevée (70%), et les survivantes étaient de petites tailles et présentaient de nombreux problèmes de développement. Ces phénotypes invalidants ont limité l'intérêt de ces modèles pour étudier le rôle de SIRT1 à l'âge adulte. Les premières études sur des modèles pertinents de souris transgéniques ont été effectuées sur des souris surexprimant la sirtuine 1. Il a été démontré qu'une surexpression modérée de cette protéine protège l'atteinte cardiaque induite par le vieillissement ou par un stress oxydant. De manière plus inattendue, une surexpression forte de cette protéine s'est avérée inductrice d'hypertrophie et d'apoptose et a conduit à une altération de la fonction cardiaque (Alcendor, Gao et al. 2007).

Plus récemment, des modèles inductibles permettant la délétion de SIRT1 ont permis de caractériser le rôle de SIRT1 dans le cœur. Plusieurs études ont confirmé le rôle protecteur de SIRT1 dans la mort cellulaire associée à l'insuffisance cardiaque (Pillai, Isbatan et al. 2005), à l'ischémie reperfusion (Hsu, Zhai et al. 2010), au vieillissement et au stress oxydant (Alcendor, Gao et al. 2007), à un traitement à la doxorubicine (Wang, Song et al. 2012), et a

l'exposition aux acides gras (Zhu, Yang et al. 2011). Ainsi, SIRT1, en protégeant la mort cellulaire des cardiomyocytes, limite les altérations de la fonction cardiaque. De plus, alors que SIRT1 semble nécessaire pour l'hypertrophie adaptative (Passariello, Zini et al. 2011, Sundaresan, Pillai et al. 2011), cette déacétylase protège également de l'hypertrophie pathologique induite par un stress oxydant (Vinciguerra, Santini et al. 2012). En ce qui concerne la fonction vasculaire, la surexpression de SIRT1 protège de l'hypertension et du remodelage induit par l'angiotensine II (Gao, Xu et al. 2014). De plus, alors que l'expression de SIRT1 est diminuée dans les plaques artérioscléreuses chez l'homme, son extinction chez la souris entraîne une augmentation de l'athérosclérose induite par un régime riche en acide gras (Wen, Chen et al. 2013).

Suite à ces différents travaux, SIRT1 est apparue comme une cible particulièrement intéressante pour le traitement des pathologies cardiaques. Comme preuve de concept, le resveratrol, un polyphenol décrit comme activateur de SIRT1, protège de la dysfonction cardiaque dans des modèles de surcharge de pression et dans un modèle d'hypertension artérielle (Rimbaud, Ruiz et al. 2011, Gu, Wang et al. 2014).

## B. SIRT1, une cible thérapeutique intéressante

L'ensemble des études répertoriées dans cette introduction a permis de démontrer que SIRT1 est une protéine de réponse au stress qui, de manière générale vise à rétablir l'homéostasie de la cellule et dont l'activité, finement modulée, permet la déacétylation d'un grand nombre de protéines. SIRT1 joue un rôle clé dans de nombreuses pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires, le diabète et les pathologies métaboliques, les maladies neurodégénératives, le cancer, toutes les pathologies de type inflammatoire et également dans le vieillissement. Dans toutes ces pathologies, l'activation de SIRT1 (hormis pour le cancer où la stratégie serait plutôt d'inhiber SIRT1) représente une stratégie thérapeutique particulièrement prometteuse. La première molécule utilisée pour activer SIRT1, le resveratrol, a permis d'obtenir des effets très intéressants sur de nombreux modèles de pathologies chez l'animal et a permis de confirmer l'intérêt de SIRT1 en tant que cible thérapeutique. Toutefois, les effets bénéfiques de cette molécule sont de nos jours controversés en raison de l'absence de sélectivité du resveratrol. Différentes entreprises (parmi lesquelles on peut citer Sirtris ayant comme co-fondateur David Sinclair) ont été créées avec pour objectif le développement d'activateurs spécifiques de SIRT1. La découverte de molécules prometteuses (notamment le SRT2104) par Sirtris a entraîné son rachat en 2008

par l'entreprise GlaxoSmithKline (GSK) à hauteur de \$720 000 000. Les premiers tests cliniques de cette molécule se sont révélés décevants puisque bien que tolérée par les patients (Libri, Brown et al. 2012, Hoffmann, Wald et al. 2013), aucun effet positif n'a été retrouvé chez des diabétiques de type II ou chez des fumeurs (Venkatasubramanian, Noh et al. 2013, Bakshi, Kraydashenko et al. 2014). Cette absence d'effet a été expliquée par le trop faible nombre de patients et des doses non optimales. Une nouvelle génération d'activateurs serait en cours de développement, bien qu'aucun nouvel essai clinique ne soit actuellement programmé. Il est à noter que GSK, qui continue ses recherches sur les activateurs de SIRT1, vient de fermer Sirtris en mars 2013.





## Objectifs de l'étude

L'ensemble des études présentées dans l'introduction montrent que le stress RE joue un rôle important dans le développement des pathologies cardiaques. En réponse au stress RE, l'activation de la voie UPR, qui est dans un premier temps adaptative, s'avère délétère lorsque le stress RE est sévère ou prolongé. De ce fait, le stress RE apparaît comme un processus pouvant être impliqué dans la transition du stade adaptatif vers le stade pathologique dans le cœur. L'intérêt pour le stress RE dans le domaine cardiovasculaire étant très récent, peu de choses sont donc connues à ce jour sur le rôle physiologique, les changements morphologiques et les modifications biochimiques associées au stress RE. **Les objectifs de l'étude présentée dans la première partie de ma thèse ont donc été de développer un modèle de stress RE *in vivo* et de déterminer les effets de ce stress RE dans le cœur.**

Les nombreuses études menées sur SIRT1 ont permis de démontrer que cette déacétylase joue un rôle clé dans de nombreuses pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires, le diabète et les pathologies métaboliques, les maladies neurodégénératives, le cancer et les pathologies de type inflammatoire. De manière générale, SIRT1 est aujourd'hui reconnue comme une protéine de réponse au stress permettant de rétablir l'homéostasie de la cellule. Nous avons donc proposé que SIRT1 puisse également être impliquée dans la réponse au stress RE. De plus, puisque les recherches actuelles sur le stress RE dans le domaine cardiovasculaire visent à moduler le stress RE de manière à conserver les réponses adaptatives et à limiter le déclenchement de l'apoptose délétère, nous avons émis l'hypothèse que SIRT1 pourrait jouer un rôle cardioprotecteur en modulant l'activation de la voie UPR. **L'objectif des études présentées dans la deuxième partie de ma thèse a donc été d'étudier *in vitro* et *in vivo* le rôle de SIRT1 dans la régulation de l'apoptose induite en réponse au stress RE délétère dans les cardiomyocytes.**



***Introduction***

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

***Annexes***



## I. Matériel

### I. Lignée cellulaire, cardiomyocytes et animaux

La lignée cellulaire cardiomyoblastique H9c2 a été achetée chez ATCC (n° CRL-1446 Manassas, Virginie, USA).

Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans des pièces dans lesquelles l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C étaient imposées. Le jour du sacrifice, les animaux ont été sortis seulement quelques minutes avant le sacrifice afin d'écourter au maximum la période de stress engendrée par le changement d'environnement.

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (60 mg/kg) et une thoracotomie a été réalisée afin de prélever le cœur. Après un rinçage dans une solution de Krebs sans calcium à 4°C équilibrée avec un gaz composé de 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub>, l'organe a subi, en fonction de l'expérimentation ultérieure, soit une canulation de l'aorte permettant une perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff, soit une étape de dissection. Cette dernière a consisté en l'isolement du ventricule gauche dont une partie a été immédiatement plongée dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C pour effectuer les analyses biochimiques et moléculaires ultérieures. Le morceau de ventricule restant, pour sa part, a été immédiatement utilisé pour la préparation des fibres ventriculaires nécessaires aux études de la fonction de la mitochondrie *in situ*.

Les cardiomyocytes sont isolés à partir de cœurs de rats adultes de souche Wistar âgés de 8 semaines (environ 300g). Suite à une anesthésie avec 0.5 ml de pentobarbital monosodique à 50 mg/ml en intra-péritonéal, le cœur est rapidement prélevé après thoracotomie et placé dans une solution physiologique (NaCl 117mM, KCl 5.7mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, MgCl<sub>2</sub> 1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM), préalablement placée à 4°C afin de rincer le cœur de son sang. Après dégagement de l'aorte, le cœur est canulé afin de procéder à la dissociation.

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été réalisées dans le respect de la réglementation relative à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire définie par la directive européenne 86/609/CEE.

## II. Produits chimiques et sondes fluorescentes

Le réactif DEVD-NucView™ 488 caspase-3 provient d'Interchim (Montluçon, France). Toutes les autres sondes fluorescentes viennent de chez Invitrogen. Les produits de culture cellulaire sont achetés chez Invitrogen. Tous les autres produits proviennent de chez Sigma-Aldrich et de chez Santa-Cruz.

## II. Méthodes d'études cellulaires

### I. Culture et transfection cellulaire

#### A. Conditions de culture et de traitements

La lignée cellulaire H9c2 est cultivée dans un milieu complet composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4.5 g/L de glucose, du pyruvate de sodium et de la glutamine, complété avec 100µg/mL de pénicilline, 100U/mL de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à 37°C et placées dans un incubateur en atmosphère humide et en présence de 95% O<sub>2</sub> - 5% de CO<sub>2</sub>.

#### B. Dissociation des cardiomyocytes de rats adultes

Après canulation du cœur par l'aorte sur un appareil de Langendorff en perfusion rétrograde, le cœur est perfusé avec une solution physiologique dite de « lavage » (Solution A : NaCl 117mM, KCl 5.7mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, MgCl<sub>2</sub> 1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM) constamment oxygénée et maintenue à 37°C. Cette première perfusion se fait à un débit de perfusion de 6 mL/min pendant 5 minutes. La dissociation débute par le passage en perfusion de solution supplémentée de collagénase de type A à 1mg/mL (0.232 U/mg, Roche Diagnostics) avec une concentration en Ca<sup>2+</sup> libre fixée entre 20 et 25 µM (Solution B). Cette étape permet la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire de façon homogène. Après 45 minutes de perfusion à un débit de 4 mL/min, le cœur est décroché de la canule, séparé de ses oreillettes et les myocytes sont dissociés mécaniquement dans la solution C (solution B dépourvue de

collagénase) et laissés à décanter. Pour éviter une augmentation trop forte de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  néfaste à l'intégrité cellulaire, le retour vers une concentration calcique intracellulaire physiologique est effectué progressivement en deux temps dans la solution C (70  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant 5 minutes à 37°C sous agitation lente, puis 320  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant 10 minutes). Les cellules vivantes sont ensuite séparées des cellules mortes par la mise en place d'un gradient en présence de BSA 5 mg/mL dans la solution D (NaCl 117mM, KCl 5.7mM,  $\text{NaHCO}_3$  4.4mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mM,  $\text{MgCl}_2$  1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM ;  $\text{Ca}^{2+}$  300 $\mu\text{M}$ , BSA 5mg/mL). Les cellules préalablement décantées, sont resuspendues deux fois dans cette solution pendant 10 minutes de façon à ne favoriser que la sédimentation des cellules vivantes. Après comptage des cardiomyocytes en cellule de Malassez, les cellules sont réparties dans des boîtes de Pétri au préalable tapissées de laminine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour favoriser leur adhésion, à raison de  $2 \cdot 10^4$  de cellules par puits de plaque vingt-quatre puits, dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium) additionné de SVF 2.5 %, P/S 1 %, HEPES 2 % et  $\text{Ca}^{2+}$  1.2 mM. Après environ 1 heure d'incubation à 37 °C en atmosphère humide et à 95 %  $\text{O}_2$  - 5 %  $\text{CO}_2$ , les cellules adhèrent à la laminine et le milieu est remplacé par un milieu sans SVF pour éviter la dédifférenciation des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes sont alors maintenus jusqu'à 48h en culture pour l'ensemble des expérimentations.

### C. Transfections siRNA

Le siRNA SIRT1 (Santa Cruz) a été transfecté selon les instructions du fournisseur. Le taux de transfection a été mesuré en utilisant un siRNA couplé au FITC. Les volumes décrits sont utilisés pour la transfection de 25 000 cellules H9c2. Après la préparation d'un mix contenant 3 $\mu\text{L}$  d'agent transfectant dans 50 $\mu\text{L}$  de milieu de transfection et d'un mix contenant 16pmol de siRNA dans 50 $\mu\text{L}$  de milieu de transfection, les deux mix sont mélangés puis incubés 45 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite dilué dans du milieu de transfection pour obtenir un volume final de 300 $\mu\text{L}$  qui est déposé sur les cellules en culture. Six heures après la transfection, 300 $\mu\text{L}$  de DMEM supplémenté de 20% de SVF et de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pénicilline et streptomycine sont ajoutés au milieu de transfection. Vingt-quatre heures après le début de la transfection, les cellules transfectées avec le siRNA fluorescent sont analysées par cytométrie en flux, les cellules transfectées avec les siRNA contrôle ou SIRT1 sont rincées puis traitées. Dans ces conditions, le taux de transfection obtenu est d'environ 90% et la protéine n'est plus détectable jusqu'à 48 heures post-transfection.



## II. Cytométrie en flux

### A. Analyses cytométriques

Les données cytométriques sont obtenues avec un cytomètre Cell Lab Quanta MPL (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pour chaque échantillon, 5 000 cellules sont analysées. Dans chaque expérience, sont exclus de l'analyse les débris et les agrégats cellulaires.

### B. Mesure du taux de mortalité cellulaire

La sonde fluorescente fluorescéine diacétate (FDA) a été utilisée pour évaluer la mortalité cellulaire. Après traitement, les cellules ont été incubées avec 0.1 µg/ml de FDA pendant 5 min à 37°C. Le FDA est clivé par les estérases cellulaires en un produit fluorescent. Dans les cellules mortes, les estérases n'étant plus actives, le FDA n'est pas clivé et donc n'émet pas de fluorescence.

### C. Mesure de la chute du $\Delta\Psi_m$ et de la nécrose

Après incubation avec les drogues, les cellules sont marquées pendant 30 minutes à 37°C avec 10 nM de DiOC<sub>6</sub>(3) qui s'accumule dans les mitochondries en fonction de leur potentiel de membrane. Pour chaque échantillon analysé, l'intégrité de la membrane plasmique (perdue lors de la nécrose) est évaluée en mesurant la perméabilité des cellules à l'iodure de propidium (10 µg/mL final), ajouté dans l'échantillon quelques minutes avant la mesure en cytométrie.

### D. Mesure de l'activation de la caspase-3

L'activation de la caspase-3 a été mesurée grâce au substrat DEVD-NucView 488. Après traitement, les cellules ont été incubées avec 5 µM de DEVD-NucView 488 pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière puis analysées en cytométrie. Le substrat est clivé par les caspases-3 actives en un produit fluorescent vert qui se fixe à l'ADN, ce qui permet de détecter les cellules dont les caspases-3 sont activées.

### III. Microscopie

#### A. Microscopie à fluorescence

##### 1. Observation de la morphologie du noyau

La morphologie du noyau a été observée après marquage des cellules H9c2 avec la sonde Hoescht 33342 à 2,5  $\mu$ M pendant 30 min à 37°C, grâce à un microscope à fluorescence (DMRH Leica).

##### 2. Mesure de la mortalité des cardiomyocytes

Après dissociation puis traitement pendant 24h, les cardiomyocytes adultes de rats sont marqués avec la sonde FDA (0,2 $\mu$ g/ml) pendant 5 minutes à 37°C, puis observés grâce à un microscope à fluorescence (DMRH Leica). Les cellules vivantes (fluorescence verte) et les cellules mortes (non fluorescentes) sont comptées manuellement (environ 500 cellules comptées par conditions).

#### B. Microscopie électronique à transmission

Les cellules H9c2 ont étéensemencées en plaque 6 puits. Après traitement, les cellules sont fixées dans un tampon contenant 2% de glutaraldéhyde et 0,1M de cacodylate de sodium pendant 1h à température ambiante. Puis elles sont rincées dans un tampon contenant 0,1M de cacodylate de sodium et 0,2M de sucrose pendant 1h à température ambiante. Les échantillons sont inclus dans de la paraffine, coupés et montés sur lames. Les images ont été obtenues à la plate-forme de microscopie électronique de l'INRA (Jouy-en-Josas, France).

### IV. Dosage colorimétrique de protéines

La concentration protéique des échantillons est estimée par dosage en microplaques selon le kit micro-BCA (Pierce) puis lecture de l'absorbance à 540 nm par un spectrofluorimètre (TECAN-Genios). La réaction colorimétrique est réalisée grâce à une solution qui contient de l'acide bicinchoninique et du sulfate de cuivre (II). Les échantillons à doser sont dilués au 1/20<sup>e</sup> et au 1/50<sup>e</sup> dans de l'eau ultrapure. Après ajout de 200  $\mu$ L de la

solution de réaction, les échantillons sont incubés 15 min à 65°C ou 30 min à 37°C. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe  $\text{Cu}^+$  final à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration en protéines étant proportionnelle à l'absorbance, elle est déterminée par comparaison de l'absorbance des échantillons avec celle d'une gamme étalon de concentration connue réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

## V. Gel SDS-PAGE et immunodétection par Western Blot

Les protéines des cellules H9c2 sont extraites par un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% acide déoxycholique) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2mM), un cocktail d'inhibiteurs de déacétylases (Santa Cruz) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (NaF 50mM, NaPPi 5mM, DTT 1mM,  $\beta$ -glycérophosphate 1mM, Orthovanadate 1 mM) pendant 30 min à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 30 minutes à 20 000g à 4°C, les protéines extraites sont dosées par le test BCA puis dénaturées par chauffage pendant 5 min à 95°C en présence de tampon dénaturant Laemmli 5X (300 mM Tris, 50% glycérol, 12,5% SDS, 50 mM DTT, 0.05% de bleu de bromophénol, pH=6,8) en utilisant 1 volume de tampon pour 4 volumes de protéines. Trente à cinquante microgrammes de protéines sont ensuite séparés par migration dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris-glycine) à 6-15% d'acrylamide (selon la taille des protéines à séparer) sous l'action d'un voltage constant de 120 V. Les gels sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF (0,45  $\mu\text{m}$ , Immobilon-P, Millipore). Le transfert est réalisé dans un appareil semi-sec Biorad (TRANS-BLOT SD®) en appliquant un courant de 15-20V pendant 45-60 minutes selon la taille des protéines à transférer. L'efficacité du transfert est contrôlée par coloration des protéines au rouge Ponceau pendant 5 min (rouge Ponceau 0,2%, TCA 0,3%). La membrane PVDF est saturée en protéines pendant 1 heure dans une solution de TBS-Tween 0,1% additionnée de BSA à 5% (p/v). Elle est ensuite incubée soit une nuit à 4°C, soit 2h à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire (dilué dans du TBS-Tween 0,1% + BSA 0,5%) dirigé contre la protéine d'intérêt.

Cible de l'anticorps	Dilution	Fournisseur
Acétyle-histone H1	1/1000e	Sigma
Acétyle-lysine	1/1000e	Cell Signaling
Acétyle-p53	1/500e	Abcam
ATF4	1/200e	Santa Cruz
$\beta$ -actine	1/20000e	Santa Cruz
CHOP	1/500e	Cell Signaling
eIF2 $\alpha$	1/1000e	Cell Signaling
eIF2 $\alpha$ -phosphorylée	1/500e	Cell Signaling
GADD34	1/200e	Santa Cruz
Grp78/BiP	1/250e	Cell Signaling
Grp94	1/500e	Cell Signaling
PERK	1/500e	Cell Signaling
PERK-phosphorylée	1/500e	Cell Signaling
SIRT1	1/8000e	Abcam

**Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés**

La membrane est ensuite rincée avec une solution de TBS-Tween 0,1% avant d'être incubée une heure sous agitation à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les anticorps secondaires utilisés proviennent de chez Jackson Immunoresearch et sont utilisés à la dilution de 1/50000<sup>e</sup>. La membrane est rincée six fois 5 min dans une solution de TBS-tween 0,1%, puis incubée pendant 5 min en présence du substrat de la peroxydase (Millipore), avant révélation par un appareil Chemidoc XRS (Biorad) utilisant la méthode ECL selon les instructions de Millipore. Le logiciel ImageJ a été utilisé dans le but de calculer les densités relatives de chaque bande. Les intensités des bandes correspondant aux protéines d'intérêt ont été normalisées avec celles de la  $\beta$ -actine. Les données obtenues sont exprimées sous forme du ratio de ces deux intensités.

## VI. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative

Les ARN sont extraits à partir des H9c2 grâce au kit ZymoResearch QuickRNA MiniPrep, selon les instructions du fabricant. Un microgramme d'ARN totaux est reverse-transcrit par le kit BioRad iScript. Lors de la PCR quantitative, l'ADNc est amplifié par le supermix Ssofast Evagreen de BioRad en deux étapes : les ADNc sont chauffés à 95°C pendant 5 min, puis ils subissent 50 cycles de dénaturation (2 sec à 95°C) –

hybridation/élongation (5 sec à 60°C). Les amorces utilisées provenant de chez Eurofins sont listées dans le tableau 6.

Gène	Espèces	Amorce sens	Amorce antisens
ATF3	Rats souris	ATGTCCTCTGCGCTGGAGT	ACACTTGGCAGCAGCAATTT
ATF4	Rats souris	AAACCTCATGGGTTCTCCAG	TCTCCAACATCCAAGTGTCC
Calreticuline	Rats souris	CTGGGTCGAATCCAAACATAA	GCGTAAAATCGGGCATCTT
CHOP	Rats souris	TATCTCATCCCCAGGAAACG	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGTTT
EDEM1	Rats souris	TGGGCTGGATTCTTCTATG	GGTGGGTCTCCTTCTCCTTC
GADD34	Rats souris	GGACCCTGAGATTCTCTGA	GCCCAGACAGCAAGGAAAT
GRP78	Rats souris	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
GRP94	Rats souris	TGCTTCTGATGCTTTAGACAAGA	CTGTGACATGCAGCAGGTTT
INO1	Rats souris	GCTACGCGTTTCACCTTCC	CCATAATAGTTTGCCTCCTTGC
P58IPK	Rats souris	CAGTTTCATGCTGCCGTAGA	GCTTTTGATTGCCCCATAGC
PDI4	Rats souris	CTGATTGGACACCTCCACCT	AGGGGCAAGTTTCTTGCAG
SIRT1	Rats souris	AAAAGATAATAGTTCTGACTGGAGCTG	TGAAGAATGGTCTTGGGTCTTT
XBP1s	Rats souris	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	ACAGGGTCCAAGTTGTCCAG

**Tableau 6 : Séquence des amorces PCR utilisées**

Les résultats sont analysés selon la méthode des « delta » de Cq, où Cq est le « cycle de quantification », cycle auquel le produit amplifié commence à être détecté. Le ratio suivant est calculé :  $(1+E_{\text{gène cible}})^{-(Cq_{\text{échantillon}} - Cq_{\text{contrôle}}) \text{ gène cible}} / (1+E_{\text{gène de référence}})^{-(Cq_{\text{échantillon}} - Cq_{\text{contrôle}}) \text{ gène de référence}}$ , où E correspond à l'efficacité de la réaction de PCR. Selon ce calcul, l'expression du contrôle est égale à 1.

## VII. Immunoprécipitation

Pour mesurer l'acétylation de protéines d'intérêt, nous avons utilisé une approche par immunoprécipitation (IP) en conditions dénaturantes.

### A. Lyse des cellules

Les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse dénaturant (1%SDS, 50mM Tris HCl, 5mM EDTA, 10mM DTT, 1mM PMSF, 15U/ml de DNase I à pH 7.4), complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2mM) et un cocktail d'inhibiteurs de déacétylases (Santa Cruz), puis le lysat est chauffé 5 minutes à 95°C. Pour neutraliser le SDS afin de pouvoir effectuer l'immunoprécipitation sans dégrader les anticorps, le lysat est resuspendu dans un tampon non-dénaturant (1% triton, 50mM Tris HCl, 5mM EDTA, 300mM NaCl, 0.02% azide de sodium, 1mM PMSF, à pH 7.4) complété par un cocktail d'anti-protéases (Roche) et un cocktail d'anti-déacétylases (Santa Cruz). Le triton présent dans ce tampon va interagir avec le SDS pour former des micelles et le piéger. La lyse est achevée à la seringue (aiguille 25G), puis le lysat est centrifugé 30 minutes à 20 000g, à 4°C.

### B. Préparation des complexes billes/anticorps

Les billes magnétiques Pureproteome de chez Millipore sont lavées dans du PBST (0.1%) puis bloquées dans un tampon PBST + BSA 2% pendant 1 heure à 4°C. Les billes sont ensuite lavées dans du PBST (0.1%) puis sont incubées avec les anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt pendant 1h à 4°C.

### C. Immunoprécipitation

Les complexes billes/anticorps sont rincés dans du PBST (0.1%), resuspendus avec le lysat de protéines puis incubées 3h à 4°C sur une roue. Les complexes billes/anticorps/antigènes sont ensuite rincés dans du PBST (0.1%), resuspendus dans du tampon Laemmli, chauffées 10 minutes à 70°C puis vortexés. L'immunoprécipitat est récupéré puis déposé sur gel pour être analysé par western blot ou par spectrométrie de masse.

## VIII. Spectrométrie de masse

Pour identifier les sites acétylés d'eIF2 $\alpha$ , nous avons choisi une approche par spectrométrie de masse. Pour cela, l'immunoprécipitat obtenu avec l'anticorps anti-eIF2 $\alpha$  a été déposé sur un gel gradient 4/16% Nu-page de chez Invitrogen. Cette étape de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire permet de limiter la présence de protéines autres qu'eIF2 $\alpha$  (protéines immunoprécipitées de manière non spécifique ou protéines issues de contaminations de type kératine) dans l'échantillon qui sera analysé par spectrométrie de masse. L'utilisation de gel pré-coulés et de tampon de migration commercial permet de limiter les contaminations. Après migration, plusieurs bandes de gel de 1mm de hauteur par 1cm de largeur sont découpées aux alentours de la zone du gel correspondant à 38kDa, poids moléculaire d'eIF2 $\alpha$ . Ces morceaux de gels sont lavés puis les protéines encore dans le gel subissent une réduction par le TCEP, suivie d'une alkylation par l'iodoacétamide. Les protéines sont ensuite digérées par la trypsine et les peptides obtenus sont analysés par un spectromètre de masse de type Orbitrap (Orbitrap Velos, Thermofisher).

## III. Méthodes d'études pour le modèle animal

### I. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie

L'exploration de la fonction cardiaque par échocardiographie a été effectuée au moyen d'une sonde spécifiquement dédiée aux petits animaux (Vivid 9, 15MHz, General Electric Healthcare). Une anesthésie est réalisée par inhalation d'un gaz composé de 3% d'isoflurane et de 100% d'oxygène (débit 1L/min), de manière à obtenir une anesthésie très légère pour minimiser les effets tels que la diminution de la fréquence cardiaque. Le dispositif utilisé a permis d'obtenir des images en deux dimensions à partir desquelles le diamètre de la cavité du ventricule gauche (en diastole (Dtd) et en systole (Dts)), l'épaisseur totale des parois (postérieure (PP) + antérieure (PA)) ainsi que la fréquence cardiaque ont pu être déterminés. Ces données brutes ont également été utilisées afin de déterminer les paramètres de la contraction du myocarde, à savoir la fraction de raccourcissement ( $FR = [(Dtd-Dts)/Dtd] \times 100$ ), les volumes télédiastolique (Vtd) et télésystolique (Vts) (en ayant recours à la formule de Teicholz ( $Vtd = 7 Dtd^3 / (2,4 + Dtd)$ )) et la fraction d'éjection ( $FE = [(Vtd-Vts)/Vtd] \times 100$ ).



## II. Microscopie électronique à transmission

L'architecture de la cellule musculaire cardiaque a été observée par microscopie électronique à transmission. Cette technique développée dans les années 1930 est basée sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons à haute tension qui en passant au travers d'un échantillon perd des électrons et permet alors la constitution d'une image. Un microscope électronique à transmission (MET) présente un pouvoir de résolution beaucoup plus important (de l'ordre de l'Angström) qu'un microscope optique et permet d'obtenir des images avec un grossissement beaucoup plus grand. L'observation des échantillons de cœur de souris a été réalisée en collaboration avec le Dr Marta Novotova (Institute of Molecular Physiology and Genetics, Bratislava, Slovaquie).

L'observation des échantillons par microscopie électronique nécessite une première étape de fixation des tissus qui a été initiée par perfusion rétrograde du muscle cardiaque selon la méthode de Langendorff. Le myocarde a ainsi été perfusé pendant 5 minutes avec une solution de Krebs sans calcium à 4°C équilibrée avec un gaz composé de 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub>, puis la solution saline a été remplacée par une solution fixant les protéines (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1, Glutaraldéhyde 2 % ; pH : 7,3). Le myocarde a été perfusé pendant 5 minutes avec cette solution avant d'être retiré de la canule pour être plongé dans cette même solution de fixation durant 45 minutes. Les muscles papillaires ainsi qu'une partie superficielle de la paroi interne du ventricule gauche ont ensuite été isolés et traités de nouveau 45 minutes dans la solution de fixation. Après avoir été rincées une dizaine de fois dans une solution exempte de glutaraldéhyde (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1 ; pH : 7,3) pendant 10 minutes, ces pièces de tissus ont été traitées 45 minutes avec une solution d'osmium permettant la fixation des lipides membranaires (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1, Osmium 1 % ; pH : 7,3). Consécutivement à un lavage à l'eau distillée de 10 minutes, les tissus ont été traités avec une solution saturée d'acétate d'uranyle, indispensable pour obtenir un bon contraste des membranes. Les échantillons ont ensuite été déshydratés au moyen de bains d'alcool à concentration croissante puis de bains d'acétone avant d'être plongés dans un mélange d'acétone et de durcupan durant une heure. Les pièces de tissus ont enfin été disposées selon l'orientation choisie (longitudinale ou transversale) pour être inclus dans du durcupan qui polymérise pour constituer un bloc. La réalisation des coupes ultrafines a été réalisée au moyen d'un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant qui, à partir des blocs, produit des tranches de tissus d'une épaisseur comprise entre 60 et 90 nm. Après avoir été préalablement traitées au

citrate de plomb, les coupes ont été insérées dans la chambre du MET (JEM 1200) afin d'y être observées avec des grossissements variant de x4000 à x100000.

### III. Mesure de l'apoptose des cardiomyocytes par la méthode TUNEL

La mort cellulaire par apoptose a été mesurée sur des coupes de cœur de souris grâce à la méthode TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) en utilisant le kit Apoptag de chez Millipore. Le clivage de l'ADN par les endonucléases activées au cours du processus apoptotique génère des extrémités 3'OH libres. La terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) est une enzyme qui catalyse l'accrochage de nucléotides (dUTP) couplés à la digoxigénine aux extrémités 3'OH. La digoxigénine peut ainsi être reconnue par un anticorps couplé à une peroxydase, ce qui permet le marquage des noyaux apoptotiques. Brièvement, en accord avec les instructions fournies avec le kit, les cœurs ont été fixés dans 10% de formaline puis inclus en paraffine. L'apoptose a été détectée sur des coupes de tissus de 4µM d'épaisseur par un scanner de lames (Scanscope, Aperio). La surface des zones positives a été quantifiée puis exprimée en pourcentage de la surface totale de la coupe de cœur (logiciel TRIBVN ICS Framework).

### IV. Mesure des capacités oxydatives des mitochondries

L'évaluation de la fonction de la chaîne respiratoire des mitochondries a été réalisée au moyen de la technique des fibres cardiaques perméabilisées mise au point en 1987 par Vladimir Veksler et ses collègues (Veksler, Kuznetsov et al. 1987). Cette méthode repose sur le traitement des fibres cardiaques avec la saponine qui est un détergent perforant sélectivement le sarcolemme, tout en laissant les membranes des structures internes (mitochondries, RS...) intactes, en raison de sa forte affinité pour le cholestérol. Cette perméabilisation permet à des substrats exogènes de pénétrer dans la cellule et de stimuler les mitochondries dont la fonction est évaluée par la mesure de la consommation de dioxygène reflétant les capacités oxydatives de l'organite.

## A. Préparation des fibres perméabilisées

Immédiatement après le sacrifice et le rinçage du cœur, le ventricule gauche a été isolé et transféré dans une solution dite relaxante ((en mM) : EGTA (10),  $\text{CaCo}_3$  (2,77), KOH (70), imidazole (20),  $\text{Mg}^{2+}$  libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), MgATP (5,7), phosphocreatine (15), potassium-methasulfonate (50) ; pH : 7,1). Les fibres ont alors été disséquées de manière à obtenir de petits amas de fibres de 100 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre avant d'être mises en présence de saponine (50 $\mu\text{g/mL}$  dans la solution relaxante) pendant 30 minutes à 4°C sous agitation pour une perméabilisation optimale des membranes plasmiques. Un lavage de 10 minutes à 4°C avec la solution relaxante exempte de saponine a permis l'élimination du détergent. Les fibres ont alors été conservées, jusqu'au moment de l'expérimentation, dans cette solution qui, de part sa composition, permet le maintien des fonctions cellulaires.

## B. Mesure de la respiration mitochondriale

Dix minutes avant les protocoles de mesure de la respiration mitochondriale, les fibres ont été lavées dans une solution de respiration ((en mM) : EGTA (10),  $\text{CaCO}_3$  (2,77), KOH (110), NaOH (10),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3), imidazole (20),  $\text{Mg}^{2+}$  libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), glutamate (10), malate (4), potassium-methasulfonate (100) ; pH : 7,1) supplémentée de 2mg/mL de BSA pour éliminer l'ATP présent dans la solution de relaxation. Les fibres ont ensuite été déposées dans les chambres de respiration contenant 3 mL de cette même solution de respiration contenant de la BSA ainsi que du glutamate et du malate constituant une source d'équivalents réduits (NADH) capable d'initier le transfert d'électrons depuis le complexe I de la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène des fibres contenues dans les chambres a alors été mesurée sous agitation à 22°C par une électrode à oxygène (de type Clark) reliée à une interface Oxygen Interface Model 928 (Strahtkelvin Instruments) qui transmet l'information à un ordinateur équipé du logiciel Strahtkelvin 928 System permettant l'enregistrement des données générées.

### C. Analyse fonctionnelle des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du $K_m$ pour l'ADP.

Un premier protocole nous a permis, grâce aux ajouts successifs de deux concentrations d'ADP, d'estimer un  $K_m$  pour l'ADP mitochondrial en présence ou en absence de créatine. En fin de protocole, des activateurs et des inhibiteurs spécifiques des complexes I, II et IV permettent également d'estimer l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire. Après avoir mesuré la diminution de la concentration de dioxygène dans les chambres en l'absence de fibres, qui reflète la consommation de dioxygène par la membrane de téflon de l'électrode ( $V_i$ ), la vitesse basale de consommation du dioxygène des fibres ( $V_o$ ), c'est-à-dire sans ADP exogène dans le milieu réactionnel, a été enregistrée. Cette mesure des paramètres initiaux a été suivie de l'ajout de 100  $\mu$ M d'ADP pour stimuler la phosphorylation oxydative mitochondriale. Vingt mM de créatine ont ensuite été ajoutés pour stimuler le système des transferts énergétiques des créatines kinases. Une concentration saturante d'ADP (2mM) permettant de mesurer la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de la consommation de dioxygène a été ajoutée. Enfin, un ajout de 15 mM de succinate (concentration saturante), conduisant à la production de FADH<sub>2</sub> qui est oxydé par le complexe II, a permis de mesurer l'activité simultanée du complexe I et du complexe II. Un inhibiteur spécifique du complexe I, l'amytal (1 mM), a ensuite été utilisé pour déterminer l'activité individuelle du complexe II. L'activité maximale du complexe IV a été mesurée après ajout de 0,5 mM de tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) supplémenté de 0,5 mM d'acide ascorbique pour éviter l'auto-oxydation du TMPD. La fin du protocole expérimental a été signée par l'ajout d'azide de sodium dans les chambres qui inhibe sélectivement le complexe IV. L'activité réelle du complexe IV a ainsi pu être déterminée par le calcul de la différence entre les vitesses de consommation de dioxygène mesurée avant et après l'ajout de cet inhibiteur.

### D. Analyse fonctionnelle de l'utilisation de différents types de substrats par la mitochondrie.

Le second protocole utilisé au cours de l'étude des propriétés intrinsèques des mitochondries a été élaboré dans le but de déterminer les capacités des fibres perméabilisées à oxyder un acide gras à chaîne longue (16 carbones), le palmitoyl-Coenzyme A (PCoA) ou à oxyder un substrat de type glycolytique, le pyruvate. Les fibres sont ajoutées dans la cuve de respiration dans une solution dépourvue de substrats (glutamate) mais contenant 2mM d'ADP. Cent  $\mu$ M de PCoA sont ajoutés pour mesurer la consommation d'oxygène maximale

pour ce type de substrat. En parallèle du PCoA, 2mM de Carnitine permettent la stimulation des carnitine palmitoyl transférase, le système de navette permettant l'entrée des acides gras à chaîne longues dans la mitochondrie. La consommation maximale d'oxygène pour le pyruvate est mesurée par l'ajout de 1 mM de ce substrat. En fin de protocole, 10mM de glutamate permettent une stimulation maximale de l'activité du complexe I.

## E. Analyse des données

En fin de protocole, les fibres sont récupérées afin d'être séchées sous vide à 75°C pendant une heure puis pesées. Cette étape permet la normalisation de toutes les vitesses mesurées (à l'aide du logiciel Strahtkelvin 928 System) au poids de tissu sec. L'activité des différents complexes et la capacité à utiliser les différents types de substrat ont été déduites des valeurs de vitesse de consommation de dioxygène mesurées avec le logiciel d'analyse. Les données générées par le premier protocole ont permis de calculer l'ACR (Accepting Control Ratio =  $V_{max}/V_o$ ) qui permet d'estimer le couplage mitochondriale. Ce protocole a également permis l'estimation d'un  $K_m$  pour l'ADP en présence ou en absence de créatine en utilisant la formule :  $K_m = 100 \mu M \times (V_{max}/V_{100} - 1)$

Les vitesses de consommations d'oxygène pour le PCoA et le pyruvate ont été rapportées à la  $V_{max}$  obtenue en fin de protocole de manière à calculer un pourcentage d'utilisation pour les deux types de substrats.

## V. Mesure des activités enzymatiques mitochondriales et cytoplasmiques

La fonction des mitochondries a également été déterminée par la mesure de l'activité de différentes enzymes mitochondriales. Au cours de ce travail, trois enzymes ont été étudiées: le complexe I, le complexe IV et la citrate synthase (CS). De plus, l'activité de la créatine kinase (CK), de l'adénylate kinase (AK) et de la lactate déshydrogénase (LDH) ont été mesurée pour avoir un aperçu plus complet des capacités métaboliques cardiaques.

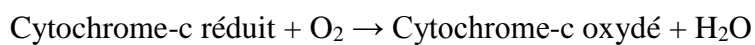
### A. Extraction des protéines

La mesure d'activité enzymatique a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Environ 30 mg de tissu pour 1 mL

de tampon d'homogénéisation à 4°C (en mM : HEPES 5, EGTA 1, DTT 1, TritonX100 0,1%; pH = 8,7) ont donc été homogénéisés au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France).

## B. Mesure de l'activité du complexe IV

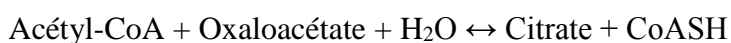
Le complexe IV, ou cytochrome-c oxydase (COX), est responsable de l'oxydation du cytochrome-c préalablement réduit par le complexe III (cytochrome-c réductase). Son activité est dosée dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) contenant 50 µM de cytochrome-c réduit à 90% (par ajout de dithionite de sodium) à 30°C.



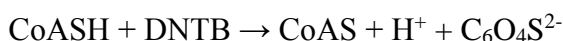
Le cytochrome-c n'ayant pas le même spectre d'absorption à l'état réduit et l'état oxydé, la disparition de la forme réduite, révélatrice de l'activité de la COX, est suivie pendant 3 minutes à 550 nm.

## C. Mesure de l'activité de la citrate synthase (CS)

La CS est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs dont l'activité est traditionnellement mesurée pour estimer la masse mitochondriale car cette activité est révélatrice de la quantité de mitochondries fonctionnelles dans le tissu. Elle catalyse la réaction de condensation de l'acetyl-CoA, obtenu à partir des réactions cataboliques des sucres et des acides gras, et de l'oxaloacétate pour former l'acide citrique (ou citrate).



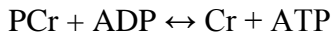
De la même manière que pour la mesure de l'activité des complexes, le dosage a été réalisé au moyen de méthodes spectrophotométriques. La réaction précédemment décrite ne permet cependant pas de mesurer directement la disparition ou l'apparition d'un des composants engagés dans la réaction. C'est pourquoi du DNTB (5,5'-ditiobis-(2-Nitrobenzoic acid) a été ajouté dans le milieu réactionnel. L'interaction de ce composé avec le CoaSH formé par la réaction régie par CS conduit à la formation de l'ion mercaptique ( $\text{C}_6\text{O}_4\text{S}^{2-}$ ) qui présente un spectre d'absorption à une longueur d'onde de 412 nm.



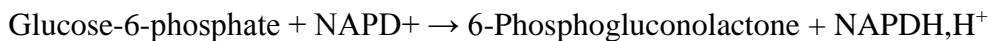
Le dosage de l'activité de la CS a ainsi été effectué en suivant l'apparition de l'ion mercaptique dans le milieu réactionnel pendant 3 minutes à 30°C.

## D. Mesure de l'activité de la Créatine Kinase totale

La Créatine Kinase est une enzyme catalysant, de façon réversible, le transfert d'une liaison riche en énergie de la PCr vers l'ADP. Cette réaction est impliquée dans le système de transfert d'énergie (voir le système CK et la navette décrits précédemment).



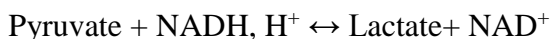
Cette réaction ne pouvant être suivie par spectrophotométrie, l'apparition de l'ATP dans le milieu réactionnel a été suivie en ajoutant des enzymes (Hexokinase (HK) et Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)) et des substrats conduisant, à mesure que l'ATP apparaît dans le milieu, à la formation du NADPH qui présente une absorbance à 340 nm.



Le dosage a ainsi été effectué dans une solution contenant: HEPES 20mM, Mg-acétate 5mM, DTT 0,5mM, Glucose 20 mM ; ADP 1,2 mM ; NADP<sup>+</sup> 0,6 mM, HK 5 U/mL et G6PDH 3,7 U/mL. Il est à noter que ce milieu réactionnel permet aussi la formation d'ATP par l'adénylate kinase (AK). C'est pourquoi une mesure de l'activité de l'AK a été réalisée avant d'ajouter 2 mM de PCr qui a alors permis la mesure de l'activité combinée de l'AK et de la CK. L'activité spécifique de la CK, qui représente l'activité globale de toutes les CK cellulaires (Mi-CK, CK liées et cytoplasmiques), a enfin été obtenue en soustrayant l'activité de l'AK à l'activité AK+CK.

## E. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase

La LDH est responsable de la dernière étape de la glycolyse anaérobie qui conduit à la formation du lactate à partir de la réduction du pyruvate.



La mesure de l'activité enzymatique de la LDH a simplement été réalisée en suivant la disparition du NADH à 340 nm durant 3 minutes à 30°C dans un tampon contenant (en mM) : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (34,1), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7,35), Pyruvate (0,63), NADH (12,4) et NaHCO<sub>3</sub> (0,12) (pH 7,5).

## F. Analyse des données de spectrophotométrie

La méthode de quantification par spectrophotométrie se base sur la loi de Beer Lambert selon laquelle l'absorbance d'une solution, à une longueur d'onde donnée, est



proportionnelle à la concentration des substances en solution capables d'absorber les rayons lumineux à cette longueur d'onde. L'évolution de la Densité Optique (DO) de chacun des échantillons au cours d'un protocole donné est donc proportionnellement liée à l'apparition ou la disparition de la molécule absorbante. Ceci permet ainsi le calcul de l'activité de l'enzyme (AE) considérée avec la formule suivante :  $AE = ((DO_{finale} - DO_{initiale}).F)/(\epsilon.L.\Delta t)$  où F correspond au facteur de dilution de l'échantillon,  $\epsilon$  à l'absorptivité molaire de la molécule absorbante ( $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\epsilon_{NADH} = 6220$  ;  $\epsilon_{Cyt-c \text{ réduit}} = 18500$  ;  $\epsilon_{C_6O_4S^{2-}} = 13600$ ), L à la longueur de la cuve (1 cm) et  $\Delta t$  au temps de mesure. Cette activité a enfin été rapportée à la concentration protéique des échantillons de manière à être exprimée en  $\mu M.min^{-1}$  par gramme de protéines.

## VI. Western Blot

L'analyse de l'expression de différentes protéines par western blot a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Environ 30 mg de tissu sont extraits dans 450  $\mu L$  de tampon de lyse à 4°C (en mM : HEPES 50, KCl 50, EGTA 1, EDTA 1, DTT 1,  $\beta$ -glycérophosphate 5, TritonX100 0,1% ; pH = 8). Ce tampon hypotonique, associé à une homogénéisation mécanique au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France) permet la lyse des cardiomyocytes. Après broyage, 150mM de NaCl est ajouté pour éviter l'agrégation des protéines, ainsi que détergents (0.1% de SDS, 0.9% de triton et 0.5% de deoxycholate) pour extraire complètement les protéines membranaires et nucléaires. Pour cela, les tubes contenant les lysats de tissus sont mis en agitation pendant 30 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 30 min à 20 000g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines extraites sont dosées par le test BCA. Le western blot est ensuite réalisé selon la méthode décrite dans les méthodes cellulaires.

## VII. Etudes statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean). Ces données ont été analysées par le logiciel Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Une ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour déterminer les éventuelles différences entre groupes, suivie d'un test post hoc de Newman-

Keuls. Quand deux groupes seulement sont comparés, les différences sont évaluées par un test t de Student.

Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $P < 0.05$ . Les légendes utilisées sur les figures sont les suivantes :

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  par comparaison avec les cellules non traitées ou avec les souris traitées avec le véhicule.

\$  $P < 0.05$ , \$\$  $P < 0.01$ , \$\$\$  $P < 0.001$  par comparaison avec les cellules traitées avec TG et TN, ou avec les souris sauvages traitées avec TN.



***Introduction***

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

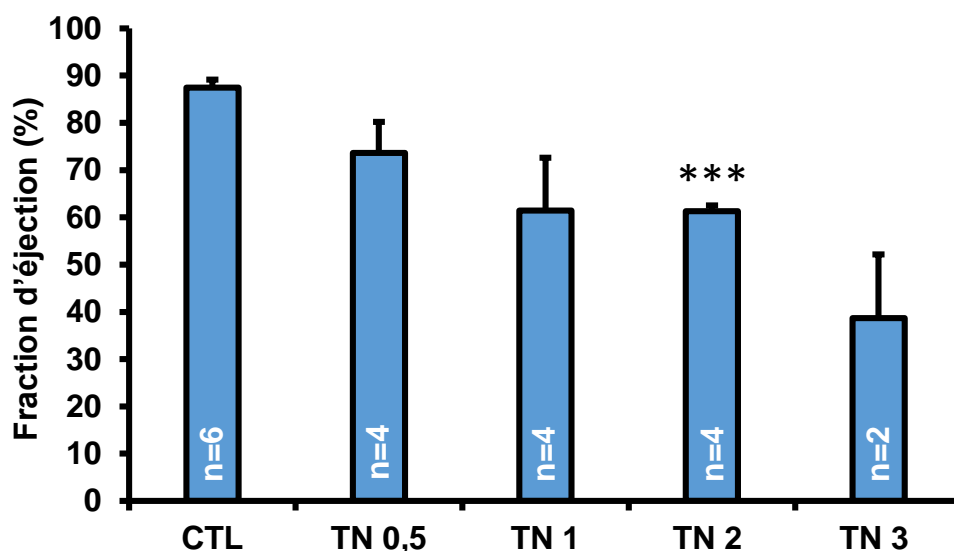
***Annexes***



## **Chapitre I : étude et caractérisation de la dysfonction cardiaque induite par le stress RE dans un modèle murin**

Bien que l'implication du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques soit désormais établie, les effets physiologiques de la réponse au stress RE sont encore mal connus. L'étude du stress RE dans le domaine cardiaque est relativement récente et seul un modèle d'induction de stress RE *in vivo* est décrit dans la littérature. Ce modèle correspond à une injection intra-péritonéale de tunicamycine (TN). La TN est un inhibiteur spécifique de la GNPTAB (N-acétylglucosamine phosphotransferase) impliquée dans la N-glycosylation des protéines (Heifetz, Keenan et al. 1979). La N-glycosylation est un processus qui n'a lieu que dans le RE et son inhibition perturbe le repliement correct des protéines, provoquant l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE et donc un stress RE. Même si ce modèle est désormais validé et a été utilisé à plusieurs reprises dans la littérature {Liao, 2012 #443; Petrovski, 2011 #445; Zhang, 2011 #52}, très peu de données sont disponibles sur le développement et les caractéristiques de la dysfonction cardiaque induite par la tunicamycine. En effet, seule la fonction contractile cardiaque, l'apoptose et l'activation de la réponse UPR ont été mesurées. Nous avons donc choisi de caractériser plus en détail les effets d'une injection intrapéritonéale de TN chez la souris, de manière à mieux comprendre le rôle du stress RE délétère dans le développement de la pathologie cardiaque.

Dans les modèles d'induction de stress RE par la TN *in vivo*, les auteurs ont mis en évidence une dysfonction cardiaque, associée à un déclenchement de l'apoptose en utilisant des doses de TN variant de 1 à 3 mg/kg. Pour déterminer la dose de TN à administrer aux souris, nous avons donc réalisé un effet dose et avons choisi d'injecter 0.5, 1, 2 et 3 mg/kg de TN puis nous avons mesuré l'atteinte de la fonction cardiaque par échocardiographie après 72h (figure 27).

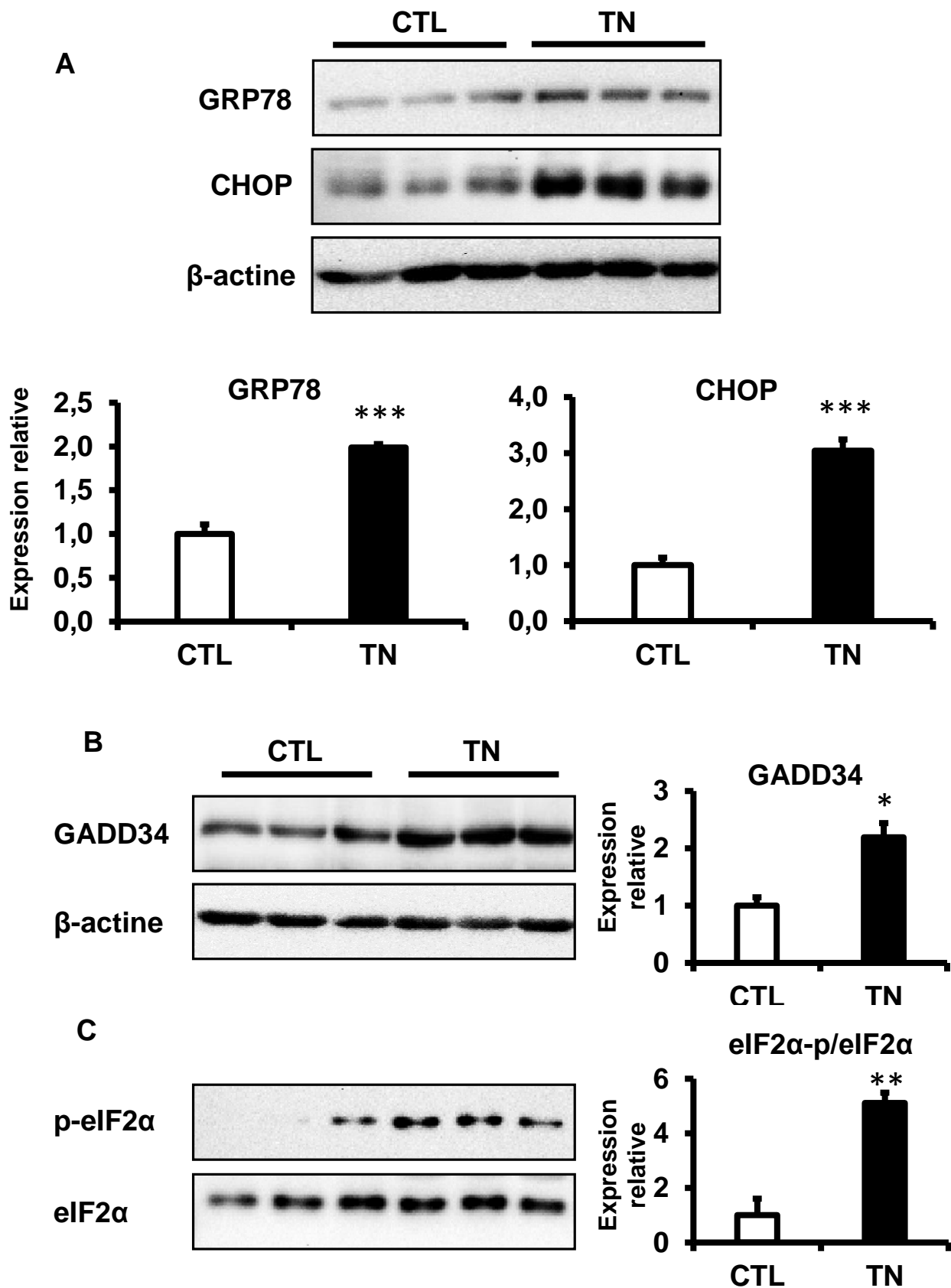


**Figure 27:** Analyse de la fraction d'éjection systolique par échocardiographie après une injection de 0.5, 1, 2 ou 3 mg/kg de tunicamycine. La dose de 2mg/kg induit une altération significative de la fraction d'éjection et sera retenue pour la suite de notre étude. CTL : Contrôle.

Même si nous avons observé une diminution de la fraction d'éjection en fonction de la dose de TN injectée, la dose de 3 mg/kg s'est révélée trop élevée puisque 60% des souris sont décédées avant l'analyse de la fonction cardiaque par échocardiographie. Les doses de 0.5 et 1 mg/kg n'induisent qu'une diminution non significative de la fraction d'éjection systolique. En revanche, la dose de 2mg/kg induit une dysfonction cardiaque clairement mesurable et a donc été retenue pour la suite de notre étude.

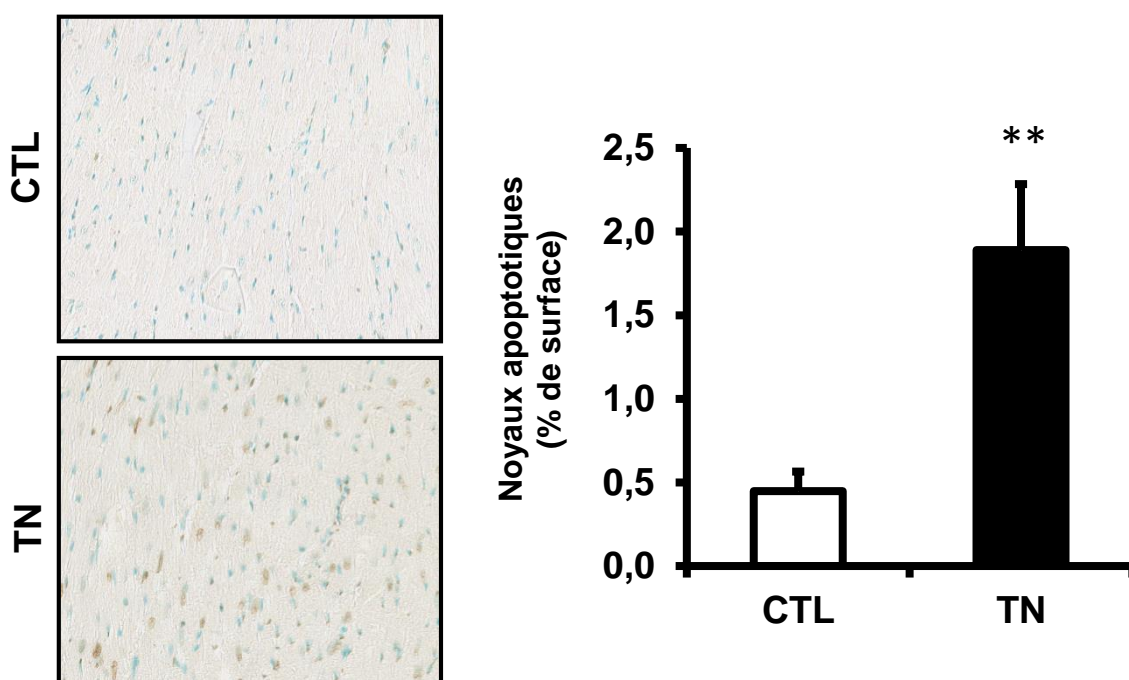
L'induction du stress RE et l'activation de la voie UPR dans le cœur en réponse à 2mg/kg TN a été mesurée par western blot. Comme le montre la figure 28, l'injection de TN induit une augmentation de l'expression de GRP78, CHOP et GADD34 et une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , démontrant l'activation d'un stress RE et de la voie UPR dans le cœur.





**Figure 28 :** L'injection de TN induit un stress RE et l'activation de la voie UPR dans le cœur. L'expression de GRP78, CHOP (A), GADD34 (B) et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (C) sont augmentées dans le cœur en réponse à l'injection de 2mg/kg de TN. CTL : Contrôle.

L'expression du facteur pro-apoptotique de la réponse au stress RE, le facteur CHOP, est régulée par les trois branches de la réponse UPR par l'intermédiaire des facteurs de transcriptions ATF4, ATF6 et XBP1s (Oyadomari and Mori 2004). L'augmentation de l'expression de CHOP que nous avons observée en réponse à l'injection de TN (figure 28) suggère que le stress RE induit est délétère et conduit au déclenchement de l'apoptose. Nous avons donc mesuré la fragmentation nucléaire caractéristique de ce type de mort cellulaire, sur des coupes de cœur de souris traitées avec la TN en utilisant la méthode TUNEL (figure 29).



**Figure 29 : L'injection de de TN induit l'apoptose des cardiomyocytes in vivo.** Les souris traitées avec 2mg/kg de TN présentent un nombre plus important de noyaux apoptotiques (marqués en marron). CTL : contrôle

Alors que la mort cellulaire est très faible dans le groupe contrôle, le stress RE induit une augmentation significative de l'apoptose comme le témoigne l'augmentation des noyaux présentant une chromatine fragmentée (marqués en marron par le marquage TUNEL).

Nous avons également mesuré la fonction cardiaque par échocardiographie et avons observé une diminution significative des fractions d'éjections systoliques et des fractions de raccourcissement, sans diminution du rythme cardiaque (Tableau 7).

L'ensemble de ces résultats montre que l'induction d'un stress RE délétère dans le cœur s'accompagne d'une altération de la fonction cardiaque associée à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes.

	CTL	TN
<b>Fraction de raccourcissement (%)</b>	47,6 ± 1,3	36,1 ± 2,1***
<b>Fraction d'éjection systolique (%)</b>	84,5 ± 1,1	72,3 ± 2,3***
<b>Diamètre du VG en mm (diastole)</b>	3,47 ± 0,09	3,54 ± 0,15
<b>Diamètre du VG en mm (systole)</b>	1,82 ± 0,08	2,18 ± 0,16
<b>Epaisseur des parois en mm (diastole)</b>	1,98 ± 0,09	1,97 ± 0,07
<b>Epaisseur des parois en mm (systole)</b>	2,96 ± 0,07	2,78 ± 0,10
<b>Rythme cardiaque</b>	487 ± 24	467 ± 17

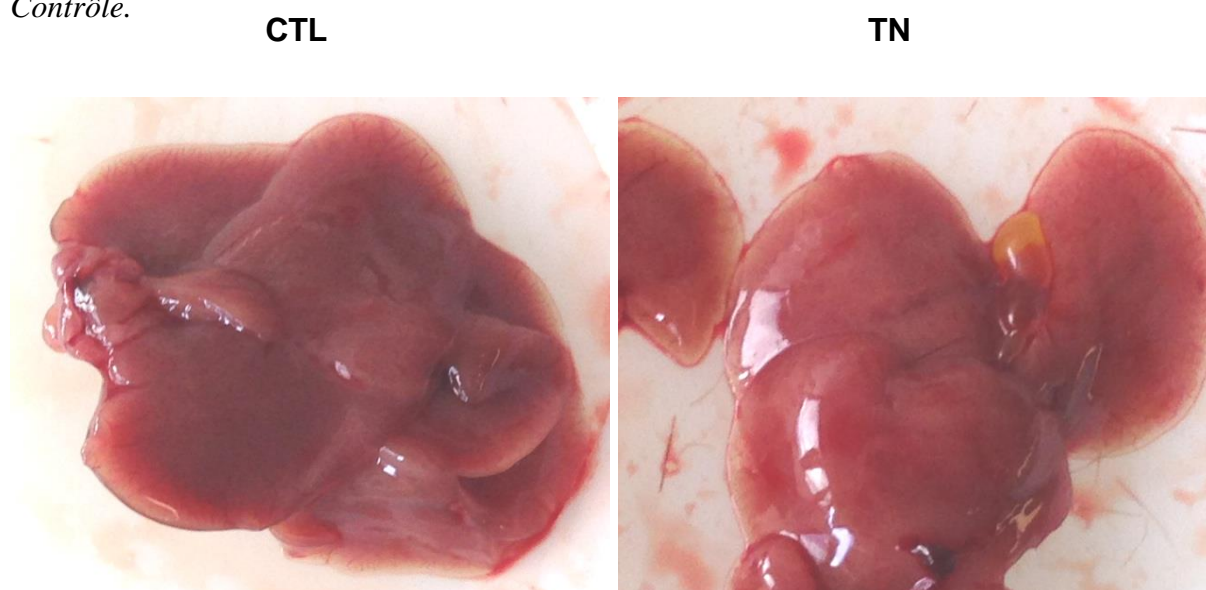
**Tableau 7 : Analyse de la fonction cardiaque par échocardiographie.** L'injection intrapéritonéale de 2mg/kg de TN induit une diminution des fractions de raccourcissement et d'éjection, sans induire de modifications significatives des diamètres ventriculaires et de l'épaisseur des parois du ventricule. CTL : Contrôle.

Notre modèle d'injection intrapéritonéale de TN ne permet pas de cibler spécifiquement le cœur et entraîne une exposition de la majorité des organes à cet inducteur de stress RE. Il est donc possible que le tissu cardiaque ne soit pas le seul à subir un stress RE. Nous nous sommes donc intéressés aux données anatomiques des souris traitées à la TN (tableau 8). Nous pouvons observer que l'injection de tunicamycine induit une diminution importante du poids corporel. Cette perte de poids est très rapide puisque les souris perdent 15% de leur poids corporel en seulement 72h et pourrait donc être lié à une perturbation de l'alimentation des souris. Les altérations de la fonction cardiaque ne sont pas associées à une hypertrophie cardiaque puisque le poids du cœur rapporté au poids total n'est pas modifié. Alors que le poids des poumons et des reins n'est pas modifié, le poids du foie est diminué de manière significative en réponse au stress RE, ce qui suggère une atteinte des fonctions hépatiques. Nous avons également observé que les foies des souris traitées à la tunicamycine

ont une coloration légèrement jaune (figure 30). Le foie étant un organe sensible au stress RE, ces observations sont cohérentes avec les données de la littérature (Yamamoto, Takahara et al. 2010, Lee, Zheng et al. 2012).

	CTL	TN
<b>Poids avant injection</b>	30 ± 0.45	30.7 ± 0.54
<b>Poids après injection</b>	29.03 ± 0.52	26.03 ± 0.61***
<b>Perte de poids</b>	0.97 ± 0.25	4.67 ± 0.55***
<b>Longueur du tibia</b>	1.86 ± 0.04	1.84 ± 0.02
<b>Poids du cœur/ poids total</b>	6.35 ± 0.19	6.28 ± 0.18
<b>Poids poumons/ poids total</b>	6.85 ± 0.19	7.05 ± 0.33
<b>Poids foie/ poids total</b>	54.80 ± 0.87	45.39 ± 1.17***
<b>Poids reins/ poids total</b>	7.38 ± 0.16	8.13 ± 0.32

**Tableau 8 : Données anatomiques des souris en réponse au stress RE.** Le stress RE induit une diminution du poids des souris, ainsi qu'une diminution de la masse du foie. CTL : Contrôle.

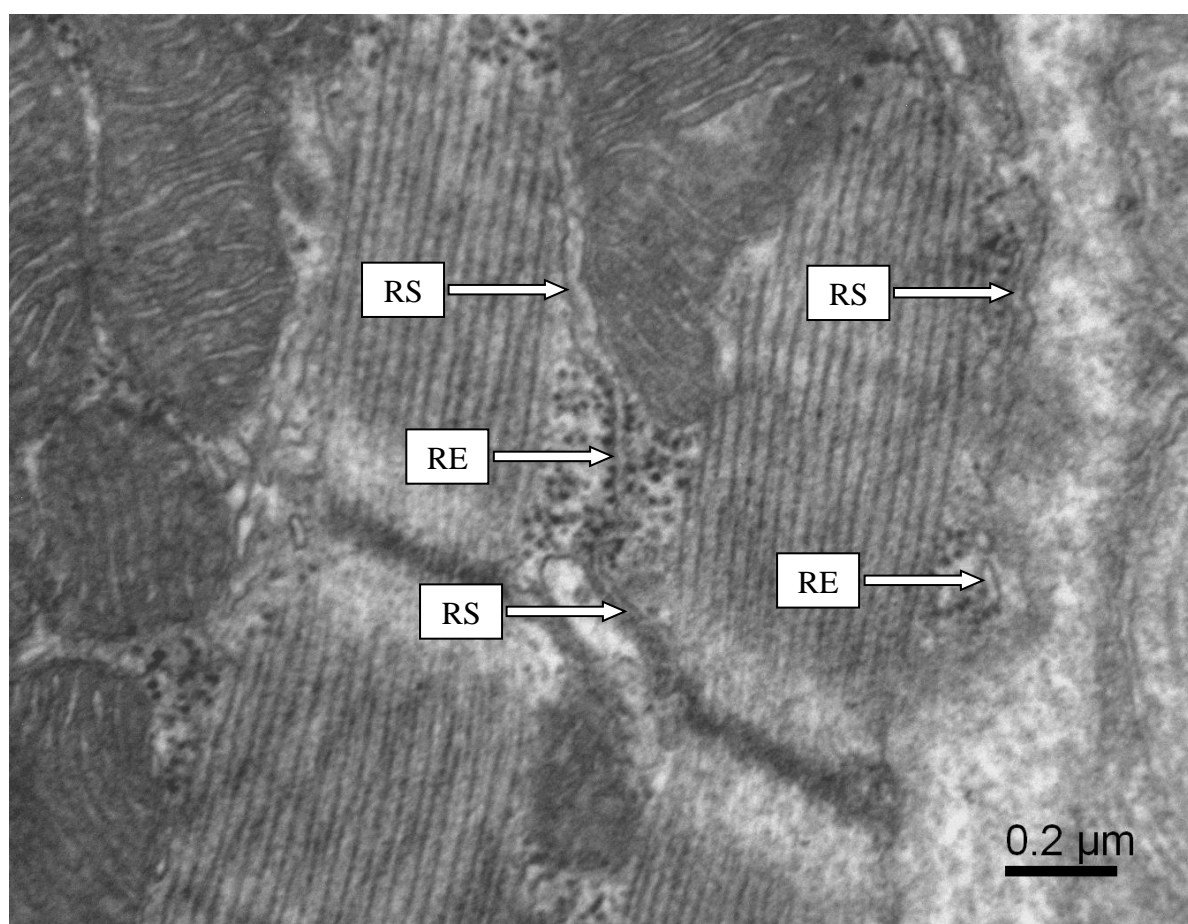


**Figure 30 : Photo de foies de souris traitées ou non avec TN.**

*Le foie des souris traitées par TN a une légère coloration jaune. CTL : Contrôle.*

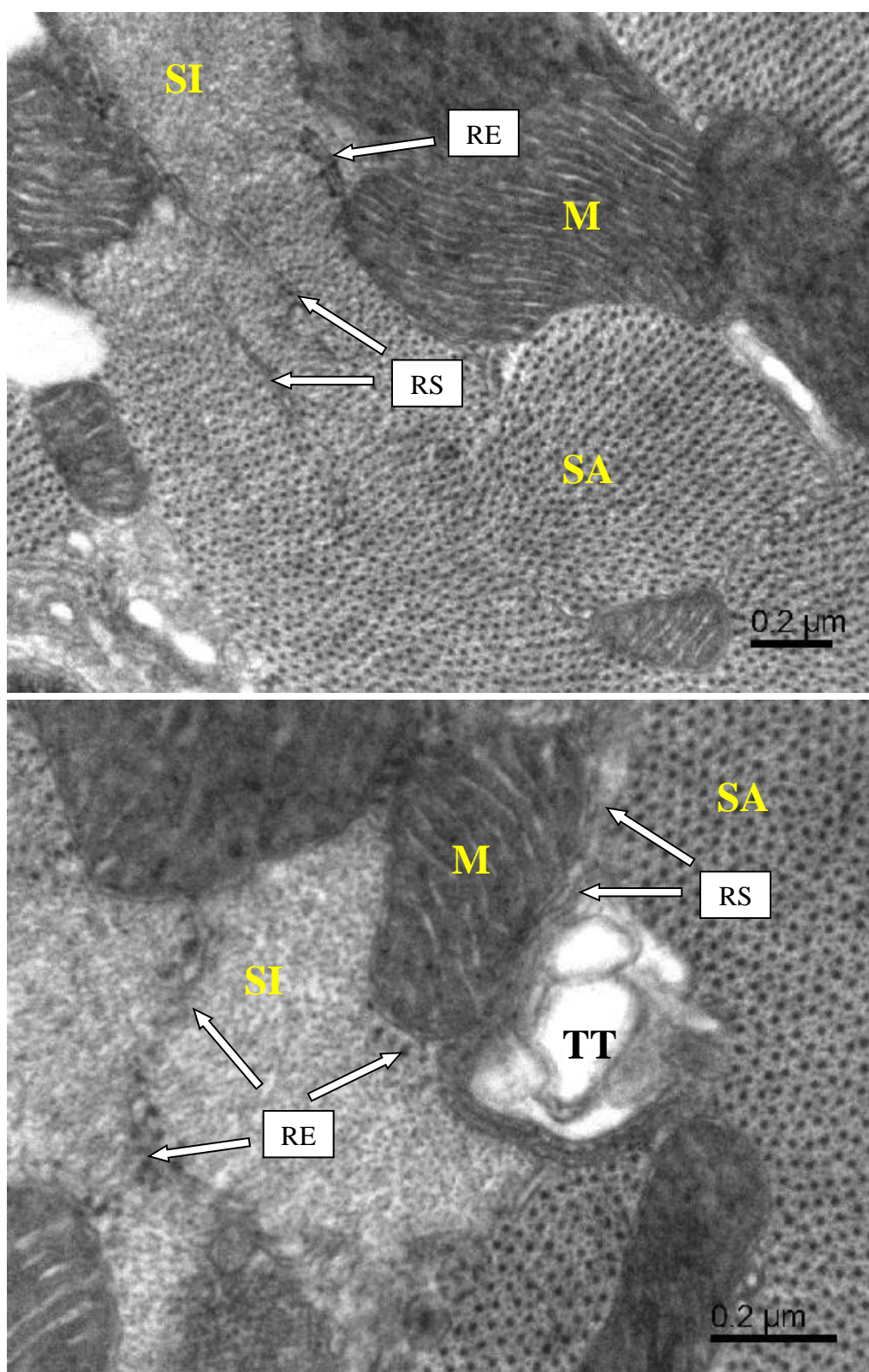
Afin de mieux comprendre le rôle du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques, nous avons caractérisé l'atteinte cardiaque induite par TN en effectuant une étude morphologique des cardiomyocytes par microscopie électronique (MET). Pour cela, après 72h de traitement à la TN, nous avons sacrifié les souris, perfusé les cœurs pour les fixer puis récupéré des morceaux de muscle papillaire et une partie du ventricule gauche.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'organisation du réticulum est sujette à controverse et l'existence de réticulum endoplasmique est encore débattue. Notre étude par MET nous a permis de mettre en évidence des zones de RS et de RE dans la continuité l'une de l'autre (figure 31). Ces images très intéressantes suggèrent que non seulement RE et RS coexistent dans le cardiomyocyte, mais aussi qu'ils peuvent être directement connectés. Nous avons également observé que le RS est localisé principalement au niveau de la bande A des sarcomères, alors que le RE est plutôt localisé près de la bande I (figure 32).



**Figure 31 : Continuité RE/RS (photo non publiée, collaboration M. Novotova).** Nous pouvons observer du RS (membrane lisse) en continuité avec du RE (recouvert de ribosomes). Ces deux compartiments sont également retrouvés distincts l'un de l'autre.

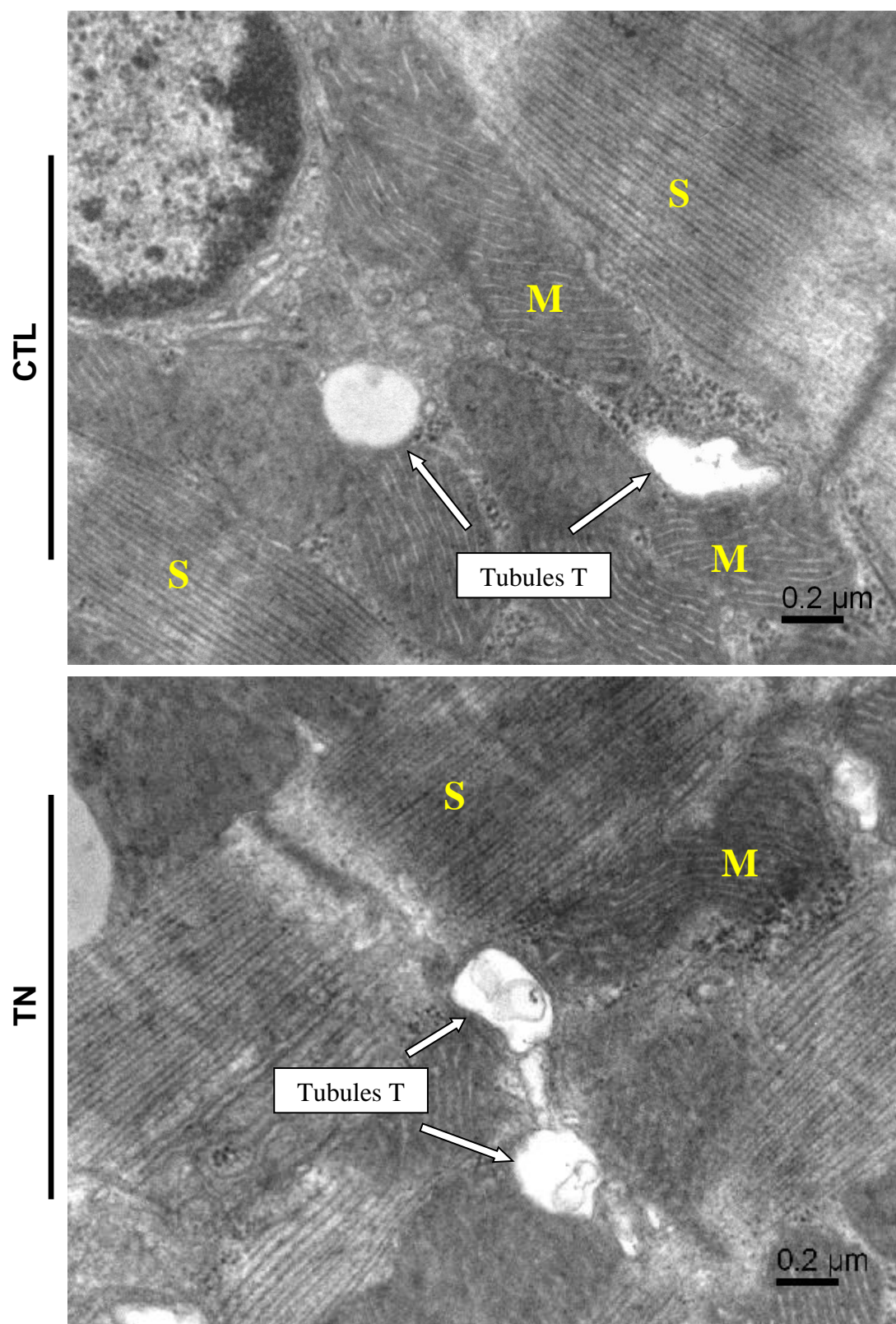




**Figure 32 : Localisation RE/RS en réponse à TN.** Le RS est situé à proximité de la bande A des sarcomères, le RE plutôt à proximité de la bande I. M : mitochondrie, TT : Tubule T, SA : bande A du sarcomère, SI : bande I du sarcomère. Coupe transversale.

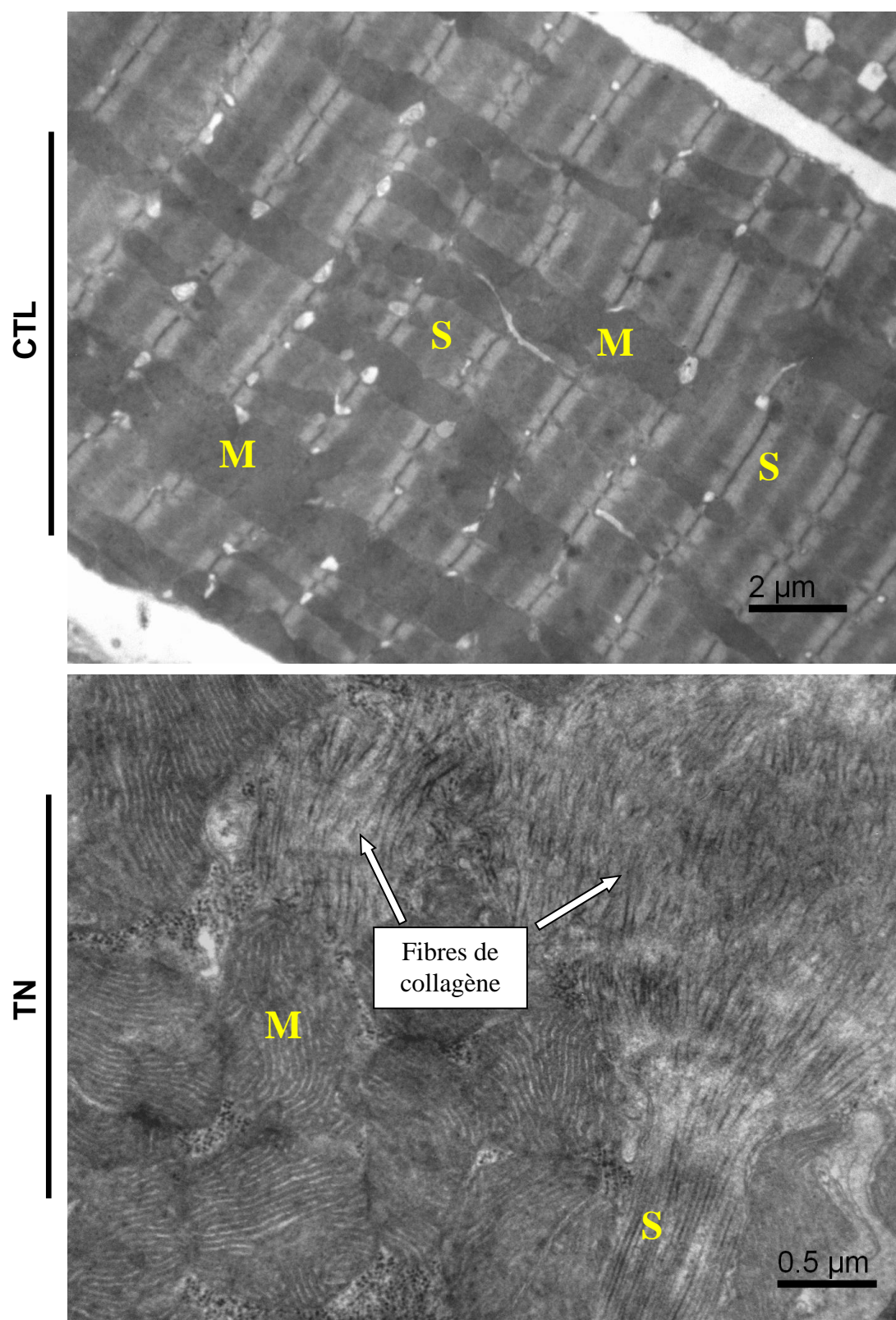
En réponse au stress RE induit par TN, différentes modifications de l'architecture des cardiomyocytes ont été observées :

- Présence de membranes dans les tubules T (figure 33).
- Présence de fibres de collagène indiquant un processus de fibrose (figure 34).
- Phénotype de myopathie et d'hypertrophie caractérisé par l'augmentation du volume du cytoplasme, la désorganisation spatiale des sarcomères et du réseau mitochondrial (figure 34).
- Présence d'agrégats de lipofuscine, qui sont des amas de lysosomes ayant perdu leur activité enzymatique et qui sont habituellement observés chez les sujet âgés. (figure 35)
- Augmentation de la quantité de RE et des ribosomes libres (figure 36).
- Augmentations des points de contacts entre le RE et les mitochondries.
- Modifications importantes des mitochondries avec la présence « d'amas » de mitochondries, une hétérogénéité de la taille et de la morphologie des mitochondries, des mitochondries avec des crêtes épaisses et enfin des mitochondries gonflées et dépourvues de crêtes dans la matrice (figure 37).
- Une augmentation importante du nombre de gouttelettes lipidiques (figure 38).

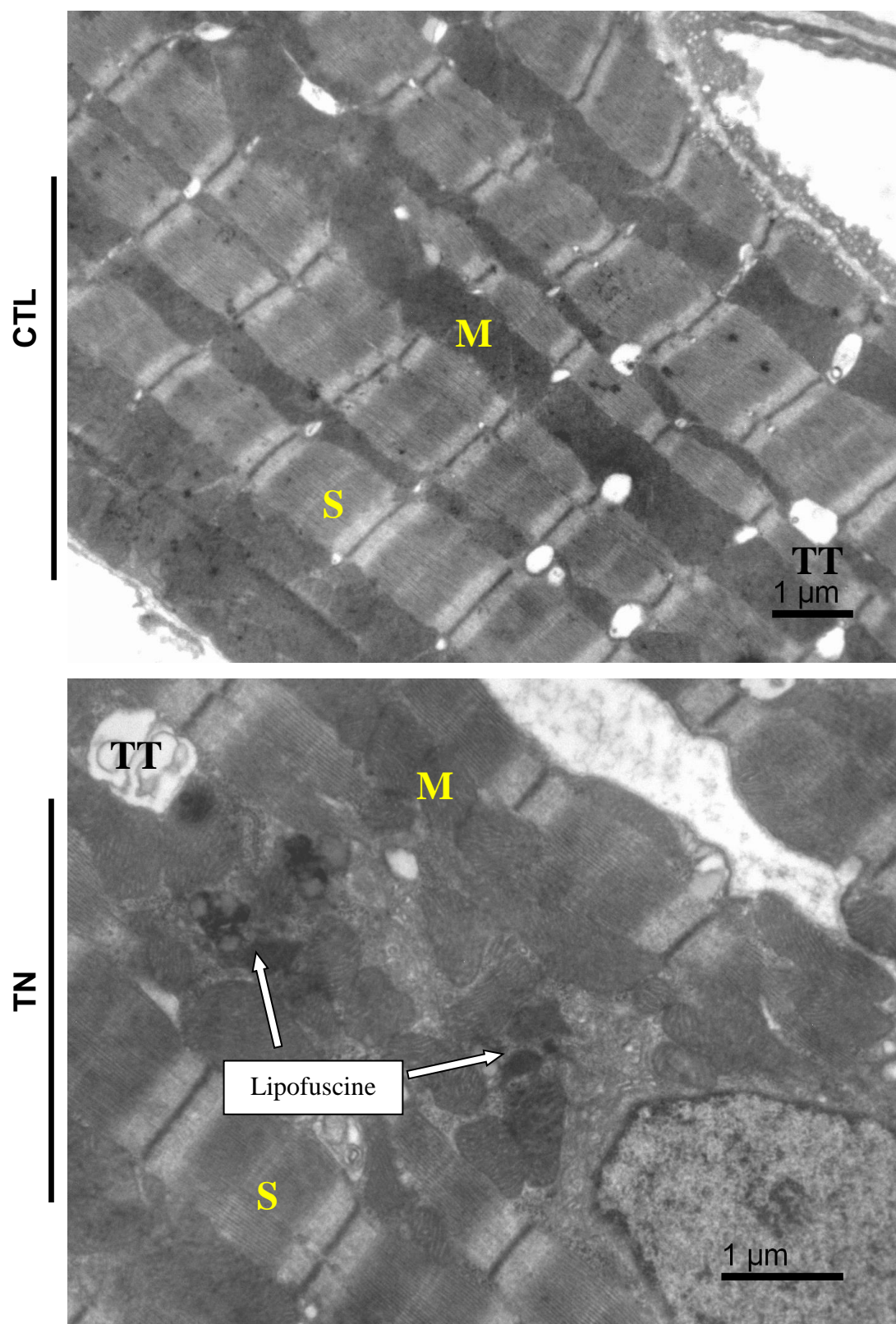


**Figure 33 :** Le stress RE induit la présence de membranes dans les tubules T des cardiomyocytes. CTL : Contrôle, S : sarcomère, M : mitochondrie.



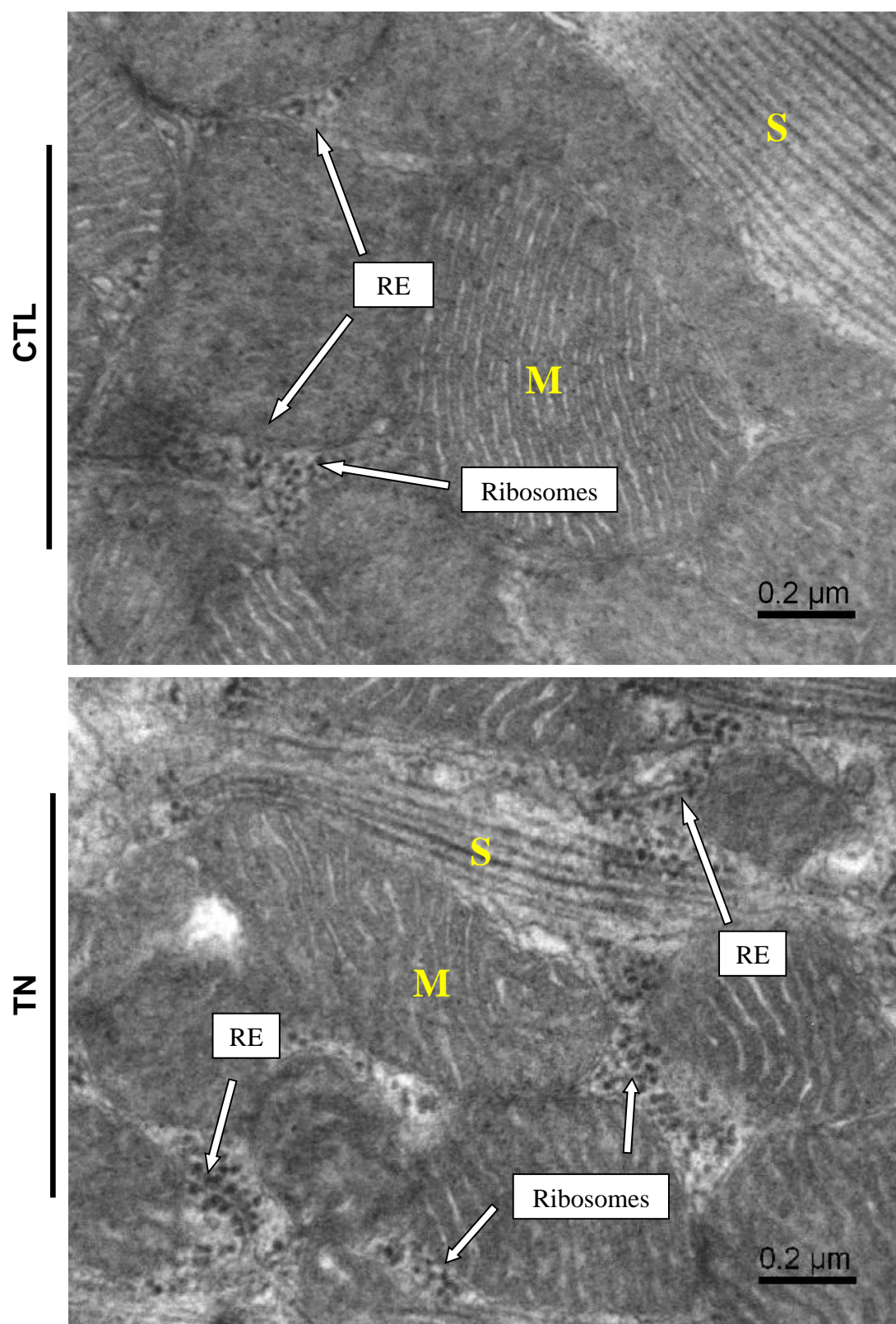


**Figure 34 : Le stress RE induit un phénotype de myopathie/hypertrophie caractérisé par une désorganisation de l'architecture des cardiomyocytes et du réseau mitochondrial et la présence de fibres de collagène. CTL : Contrôle, S : sarcomère, M : mitochondrie.**

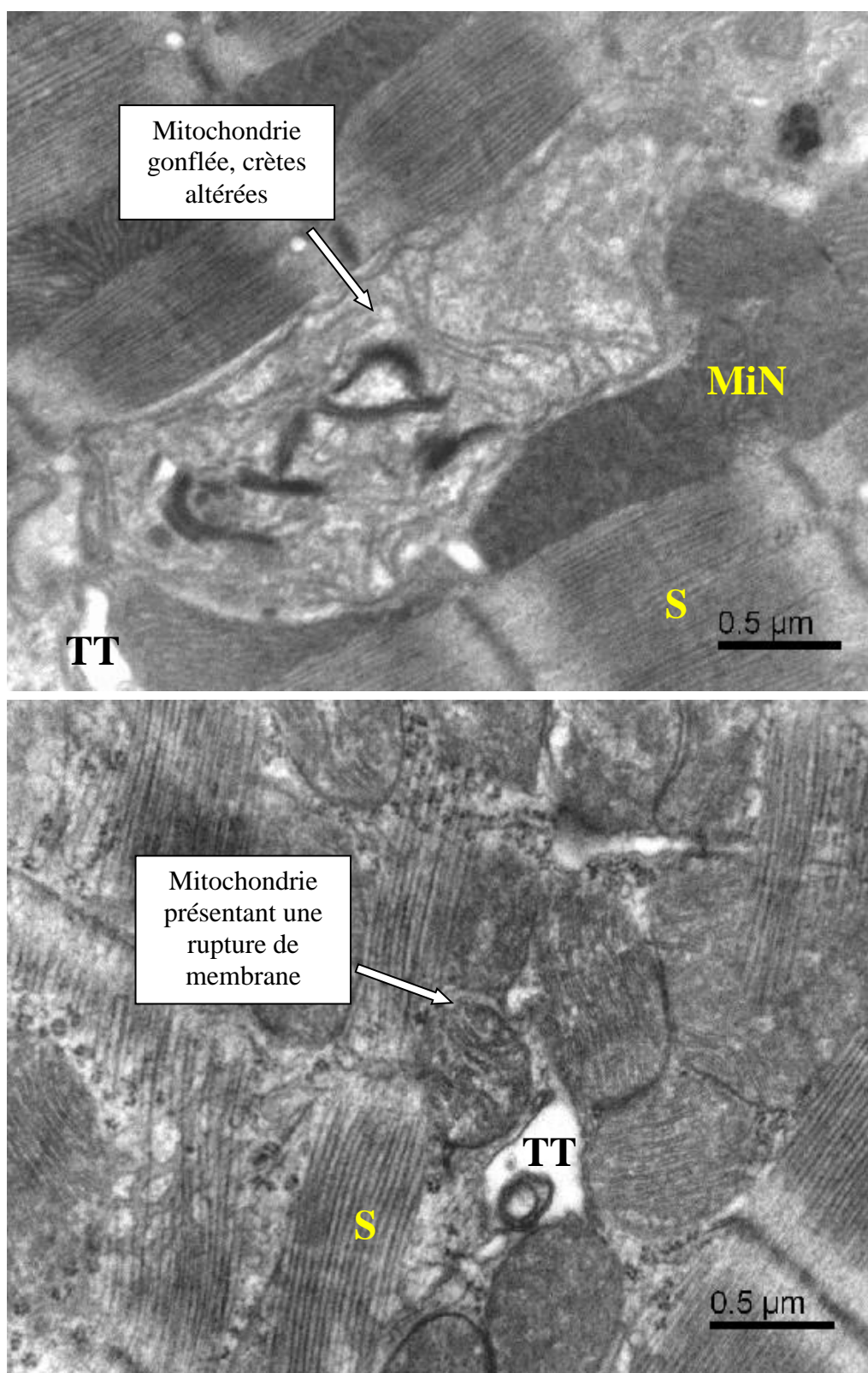


*Figure 35 : Le stress RE induit la présence de lipofuscine dans le cardiomyocyte. CTL : Contrôle, S : sarcomère, M : mitochondrie, TT : tubules T.*





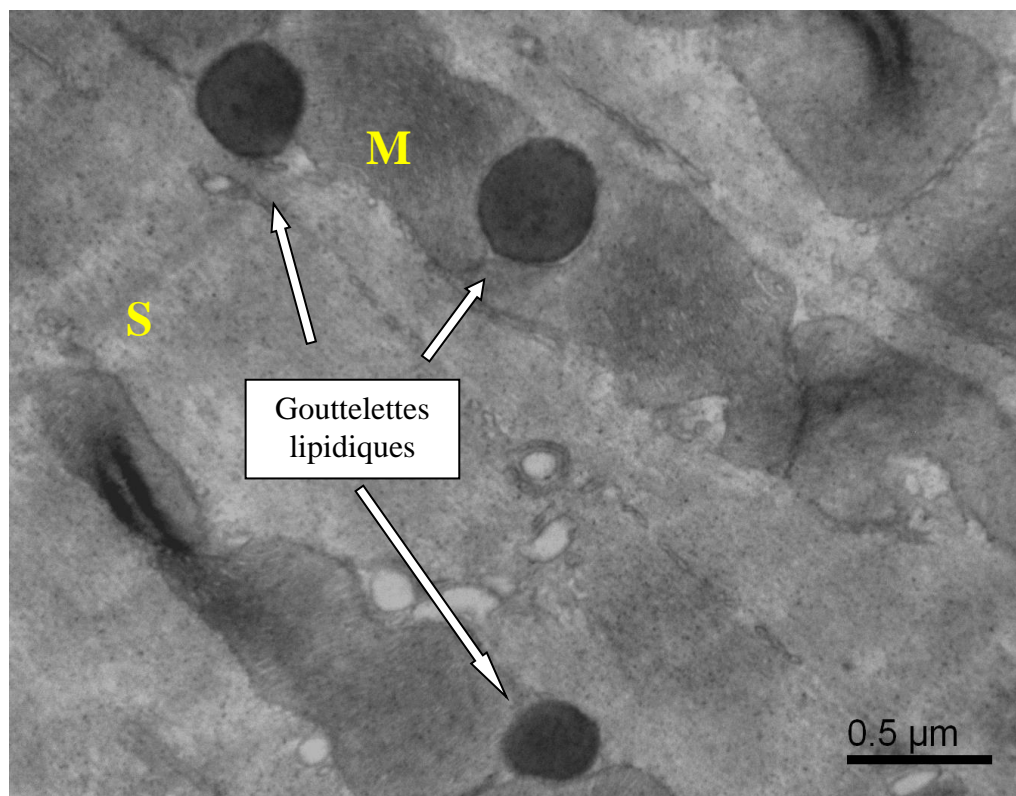
*Figure 36 : Le stress RE augmente la quantité de RE et de ribosomes libres dans le cardiomyocyte. CTL : Contrôle, S : sarcomère, M : mitochondrie.*



**Figure 37 : Le stress RE induit une altération de la morphologie des mitochondries.**

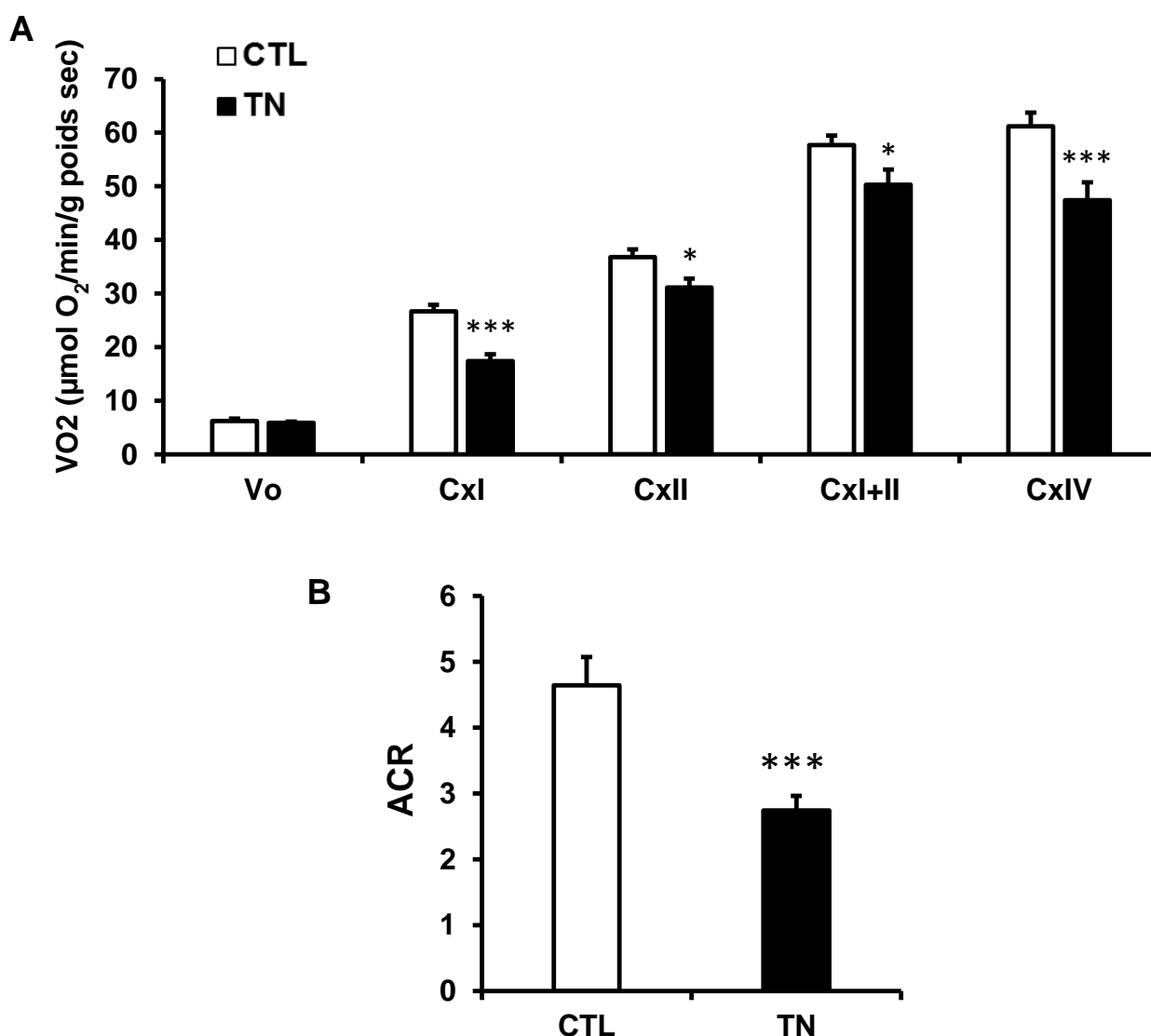
Chez les souris traitées avec TN, nous observons une hétérogénéité de la taille des mitochondries, des mitochondries gonflées et dépourvues de crêtes. S : sarcomère, Min : mitochondrie normale, TT : tubules T.





**Figure 38 : Le stress induit une accumulation de gouttelettes lipidiques.** *S : sarcomère, M : mitochondrie.*

Une augmentation des contacts entre le RE et les mitochondries a été démontrée dans différents types cellulaires en réponse au stress RE (Bravo, Vicencio et al. 2011). Ces contacts appelés MAM ou microdomaines sont connus pour faciliter, entre autres, le transfert de calcium entre les deux organites. Dans le cas d'un stress RE important, ces transferts calciques conduisent à la dépolarisation des mitochondries et au déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). Dans les cardiomyocytes, nous avons effectivement observé une augmentation des points de contacts entre le RE et les mitochondries en réponse au stress RE. De plus, les modifications importantes de la morphologie des mitochondries induite par le stress RE, suggèrent que la fonction mitochondriale pourrait être altérée en réponse au stress RE. Nous avons donc mesuré la fonction mitochondriale *in situ*, en conservant l'architecture cellulaire des cardiomyocytes. Pour cela, des fibres de muscle cardiaque ont été préparées à partir de souris traitées à la TN puis perméabilisées à la saponine. Deux protocoles caractérisés par des ajouts successifs de substrats ou d'inhibiteurs de la fonction mitochondriale nous ont permis de mesurer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que les capacités mitochondriales à utiliser différents type de substrats énergétiques.

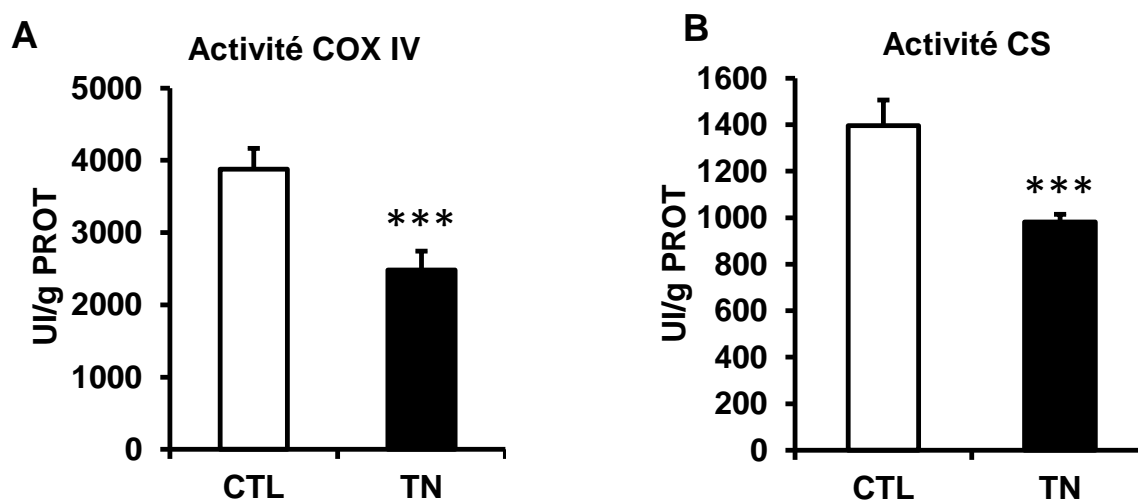


**Figure 39 : Analyse de la fonction oxydative mitochondriale sur fibres perméabilisées. (A)** Le stress induit une diminution de la consommation mitochondriale d'oxygène en présence de substrats des complexes I, II et IV, ce qui traduit une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. **(B)** L'ACR est diminué chez les souris traitées avec TN, indiquant une altération du couplage mitochondrial. CxI : Complexe I, CxII : Complexe II, CxI+II : Complexe I +Complexe II, CxIV : Complexe IV, ACR : Accepting Control Ratio. CTL : Contrôle.

La vitesse initiale de respiration (Vo), correspondant à la consommation mitochondriale d'oxygène en présence de substrats du complexe I (malate et glutamate) mais en absence d'ADP et donc sans production d'ATP, n'est pas modifiée par la tunicamycine (figure 39). En revanche, en présence d'ADP (Vmax, CxI), la consommation d'oxygène est

diminuée chez les souris traitées avec TN, ce qui reflète une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire, lors de l'utilisation du complexe I comme voie d'entrée des électrons. L'ajout de succinate, un substrat du complexe II, stimule la respiration mitochondriale (CxI+II). Là encore, la consommation d'oxygène est altérée chez les souris traitées avec TN. L'inhibition du complexe I permet de mesurer le fonctionnement de la chaîne respiratoire stimulée par le complexe II uniquement (CxII). Ce paramètre est altéré par la tunicamycine, ce qui traduit une perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire, lors de l'utilisation du complexe II comme voie d'entrée des électrons. De plus, l'activité du complexe IV est également perturbée chez les souris traitées. Enfin, le rapport entre  $V_{max}$  et  $V_o$  qui donne une indication sur le couplage mitochondrial (ACR, Accepting Control Ratio), est diminuée par TN. Ces résultats indiquent que le stress RE induit un dysfonctionnement général de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Pour confirmer ces données, nous avons mesuré, à partir de lysats de ventricule gauche, l'activité enzymatique du complexe IV (COX IV) de la chaîne respiratoire (Figure 40A) et de la citrate synthase (CS), une enzyme du cycle de Krebs (Figure 40B). L'activité de ces deux enzymes est altérée par TN, confirmant la dysfonction mitochondriale des souris ayant subies un stress RE.

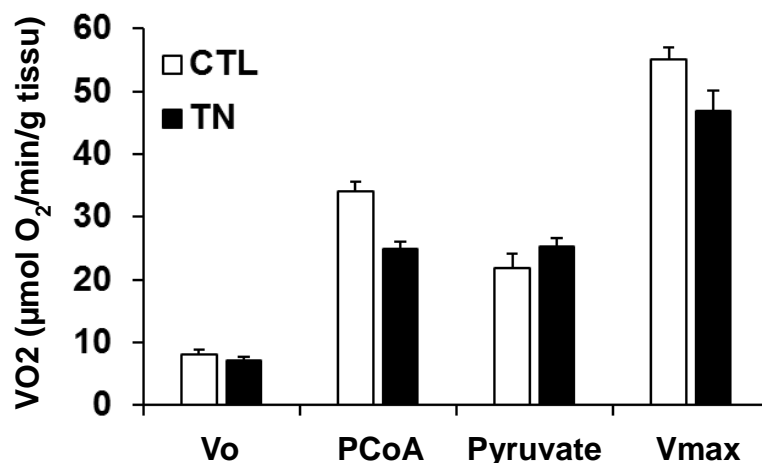


**Figure 40 : Analyse de l'activité enzymatique du complexe IV et de la citrate synthase.**

(A) Le stress RE induit une diminution de l'activité du complexe IV. (B) Les souris traitées avec TN présentent une altération de l'activité de la citrate synthase. CTL : Contrôle.

L'accumulation de gouttelettes lipidiques que nous avons observé par MET en réponse au stress RE (figure 38) suggère que l'oxydation des acides gras serait diminuée lors d'un stress RE. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la fonction mitochondriale en

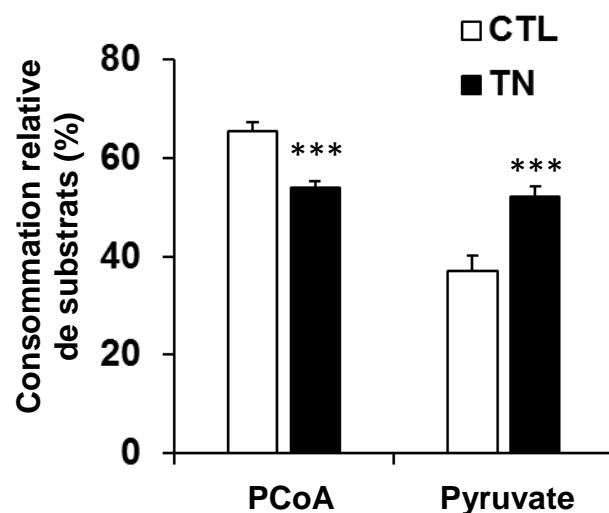
utilisant comme substrat le palmitoyl-Co enzyme A (PCoA), un acide gras à chaîne longue (16 carbones), qui nécessite un système de transporteurs pour entrer dans la matrice mitochondriale (système des carnitine palmitoyltransférases).



**Figure 41 : Utilisation des substrats énergétiques par les mitochondries en réponse au stress RE.** Le stress RE induit une diminution de la capacité à utiliser le PCoA, sans moduler l'utilisation du pyruvate. La consommation maximale d'oxygène est diminuée chez les souris traitées avec TN. CTL : Contrôle.

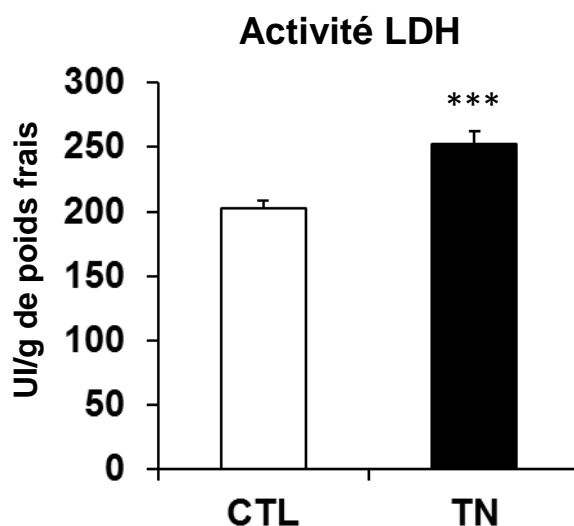
L'oxydation de cet acide gras est diminuée de manière significative dans le groupe de souris traitées avec TN (figure 41). Cependant, ce résultat ne nous permet pas de savoir si cette altération est liée à une diminution du transport des acides gras dans la mitochondrie ou à une altération du fonctionnement des enzymes de la  $\beta$ -oxydation. Nous avons également mesuré l'utilisation d'un substrat de type glycolytique, le pyruvate, dont l'utilisation par la mitochondrie est légèrement augmentée mais de manière non significative en réponse au stress RE. En fin de protocole expérimental, l'ajout de glutamate nous a permis d'obtenir la consommation maximale d'oxygène par la mitochondrie et ainsi de pouvoir calculer le pourcentage de stimulation de la respiration mitochondriale induit par le PCoA et le pyruvate (figure 42).





**Figure 42 : Utilisation relative des différents substrats énergétiques en réponse au stress RE.** Le stress RE induit une diminution de l'utilisation relative des acides gras (PCoA) et une augmentation de l'utilisation relative des substrats glycolytiques (Pyruvate).

De manière intéressante, alors que le pourcentage d'utilisation des acides gras est diminué, l'utilisation relative du pyruvate est augmentée, ce qui traduit la transition d'une utilisation préférentielle des acides gras vers une utilisation équivalente de substrats de type glycolytiques et d'acide gras. Pour confirmer ce résultat nous avons mesuré la fonction de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme capable de catalyser la transformation du pyruvate en lactate mais également capable de transformer le lactate en pyruvate et qui joue donc un rôle fondamental dans la glycolyse.



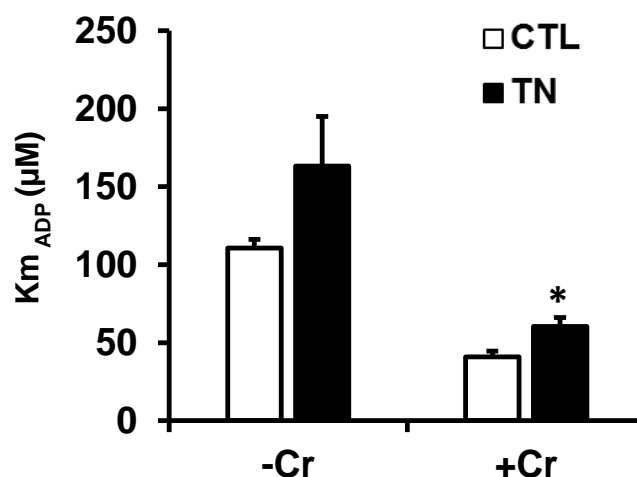
**Figure 43 : Mesure de l'activité enzymatique de la LDH en réponse au stress RE.** Les souris traitées avec TN présentent une augmentation de l'activité de la LDH.

Comme le montre la figure 43, l'activité de la LDH est augmentée par le stress RE, ce qui est caractéristique d'un changement métabolique en faveur d'une utilisation accrue des substrats de type glycolytique.

Sur les photos de MET, nous avons observé une altération de l'architecture cellulaire des cardiomyocytes. Les systèmes de transferts énergétiques étant très dépendants de l'organisation spatiale des mitochondries et des myofilaments, nous avons émis l'hypothèse que ces systèmes pourraient être perturbés. Dans l'un de nos protocoles d'étude de la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées, nous avons donc effectué, en présence de malate et de glutamate (stimulant le complexe I), deux ajouts successifs d'ADP (100µM et 2mM) qui nous ont permis d'estimer un  $K_m$  pour l'ADP grâce à la formule suivante :

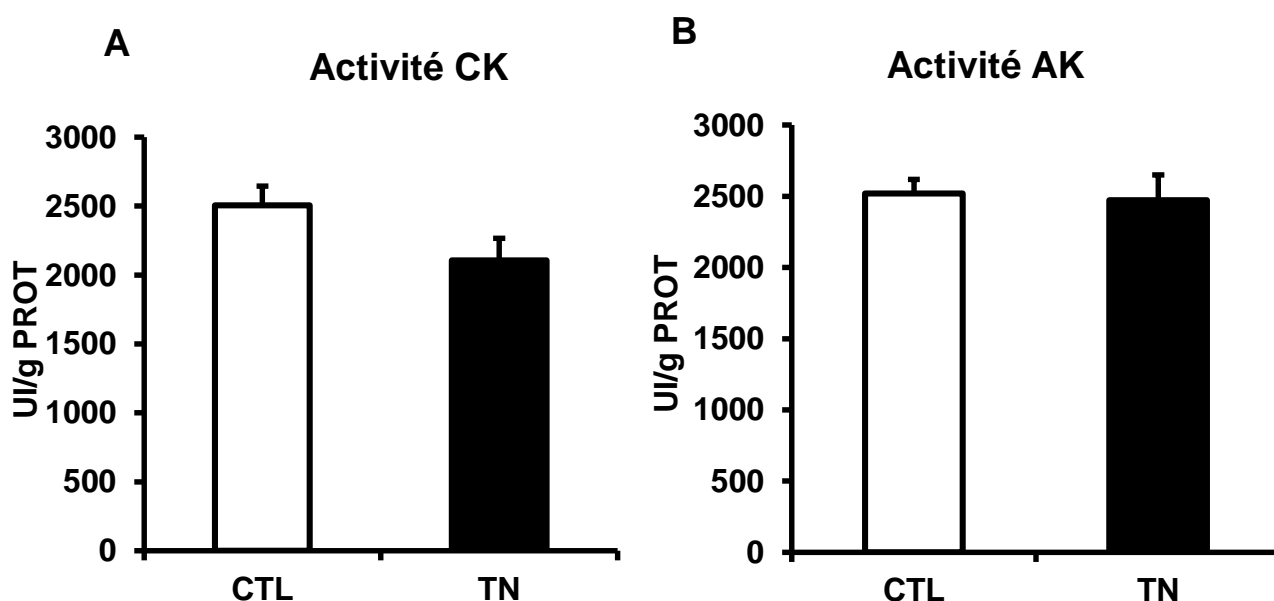
$$K_m = 100 \mu M \times (V_{max}/V_{100} - 1)$$

Le  $K_m$  permet d'estimer l'efficacité d'un système enzymatique. Plus la valeur du  $K_m$  est basse, plus le fonctionnement d'un système est stimulé de manière importante par une faible concentration de substrat et plus l'affinité de ce système envers son substrat est importante. Il est donc admis qu'une augmentation du  $K_m$  pour l'ADP correspond à une altération de la fonction mitochondriale. Si le  $K_m$  est mesuré en présence de créatine, son augmentation correspond alors à une altération du système de transfert des créatines kinases. Dans ce protocole, entre les deux ajouts d'ADP, nous avons ajouté de la créatine (20mM) afin de stimuler le système de transferts énergétiques des créatines kinases. Nous savons que dans ces conditions expérimentales, la vitesse maximale de respiration n'est pas affectée par la créatine, seul le  $K_m$  pour l'ADP est modifié. Nous avons donc pu estimer le  $K_m$  pour l'ADP en présence de créatine. Ainsi, en comparant les  $K_m$  pour l'ADP en absence ou en présence de créatine, nous avons pu évaluer l'efficacité de la navette des créatines kinase.



**Figure 44 : Km pour l'ADP en présence et en absence de créatine en réponse au stress RE.** Alors que le stress RE n'induit aucune modification significative du Km pour l'ADP en absence de créatine, le Km est augmenté en présence de créatine, ce qui indique une altération de la navette des créatines kinases. Cr : Créatine, CTL : Contrôle.

En absence de créatine, en condition de stress RE, le Km pour l'ADP n'est pas modulé de manière significative (figure 44). En revanche, en présence de créatine, le Km pour l'ADP est augmenté chez les souris traitées avec TN, ce qui reflète l'altération du système de transfert énergétique des créatines kinases en réponse au stress RE. Pour confirmer ce résultat, nous avons mesuré à partir de lysats de cœur de souris l'activité de deux enzymes impliquées dans les systèmes de transferts énergétiques : l'adenylylate kinase (AK) et la créatine kinase (CK).



**Figure 45 : Activité enzymatique de la CK et de l'AK en réponse au stress RE.**

*(A) Le stress RE n'induit aucune modification significative de l'activité de l'adénylate kinase (AK). (B) Les souris traitées avec TN présentent une diminution significative de l'activité de la créatine kinase (CK). CTL : Contrôle.*

L'activité de l'AK n'est pas modifiée en réponse au stress RE (figure 45). Cette navette n'est donc pas impliquée dans l'altération du système de transferts énergétiques induite par le stress RE. En revanche, l'activité des créatines kinases est diminuée par la tunicamycine. La principale navette impliquée dans les transferts d'énergie est donc responsable de l'altération des transferts énergétiques induite par le stress RE.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude permet de conclure que l'induction *in vivo* d'un stress RE par la TN provoque (i) l'apoptose des cardiomyocytes et une dysfonction cardiaque, (ii) une augmentation de la quantité de RE et l'activation de la voie UPR dans le cœur, (iii) une altération de la morphologie et de la fonction mitochondriale, (iv) une diminution de la consommation d'acide gras et une augmentation de l'utilisation de substrats glycolytiques, (v) une altération de la navette des créatines kinases.

## **Chapitre II. Rôle de SIRT1 dans la réponse au stress RE des cardiomyocytes**

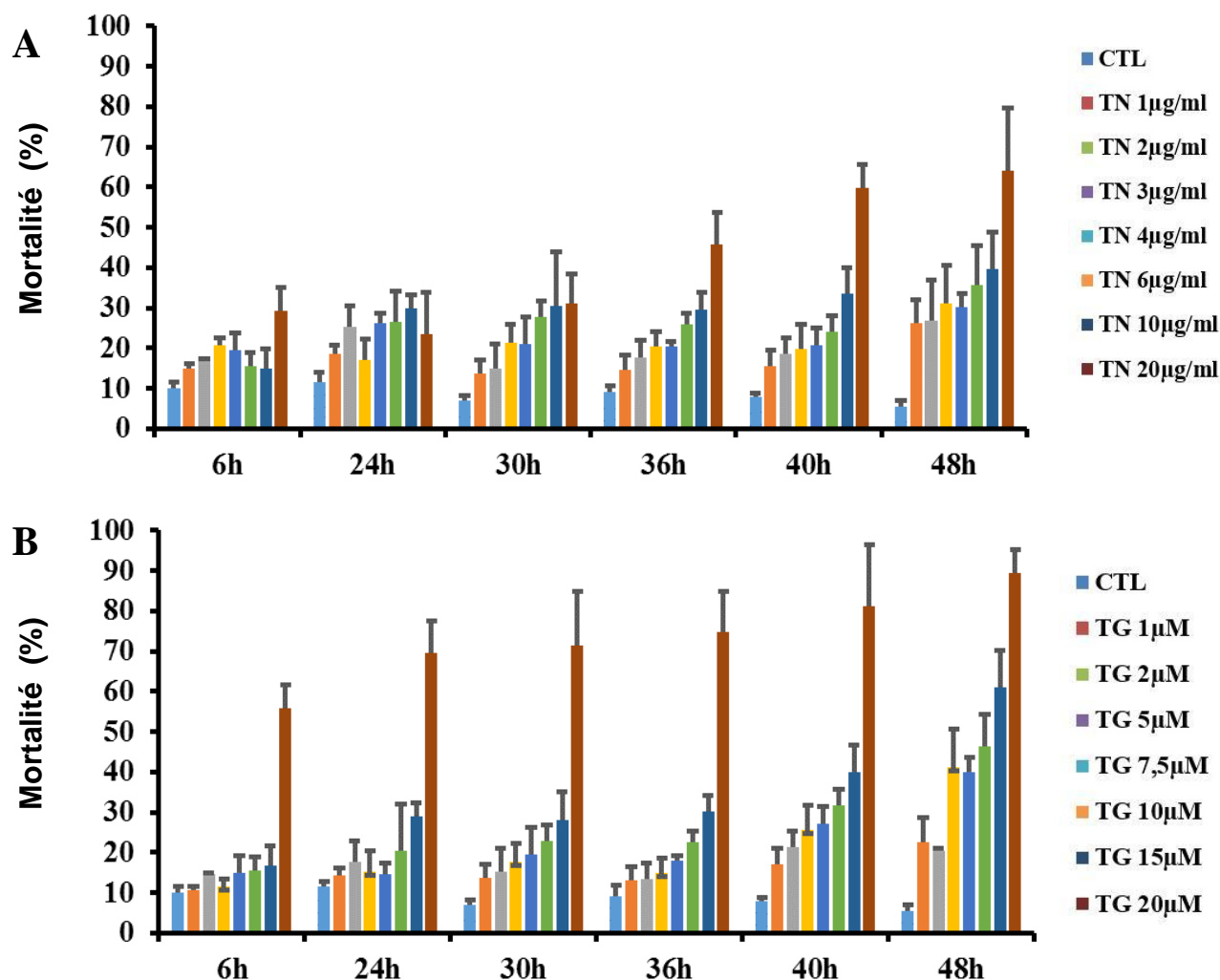
Nous avons vu que le stress RE joue un rôle crucial dans le développement de nombreuses pathologies cardiaques. L'objectif actuel des recherches sur le stress RE dans le domaine cardiovasculaire a pour but non pas d'inhiber le stress RE mais plutôt de le moduler de manière à conserver les réponses bénéfiques adaptatives et à limiter le déclenchement de l'apoptose délétère. Nous avons émis l'hypothèse que SIRT1, une déacétylase connue pour être activée en réponse à de nombreux stress cardiaques et pour jouer un rôle cardioprotecteur, pourrait réguler la réponse au stress RE et permettrait de limiter le déclenchement de l'apoptose délétère des cardiomyocytes.

Pour tester notre hypothèse, nous avons choisi de développer trois modèles d'étude de la réponse au stress RE. Les cardiomyocytes étant des cellules très différenciées avec un très faible potentiel de réplication, il n'existe pas de lignée cellulaire dérivée de ce type de cellule. La lignée cellulaire la plus proche des cardiomyocytes est la lignée de cardiomyoblastes de rats H9c2 qui possèdent certains caractères spécifiques des cardiomyocytes tels que des canaux calciques de type L (Sipido and Marban 1991). Nous avons choisi d'utiliser cette lignée cellulaire car c'est un outil qui permet de fournir des cellules en grande quantité et qui permet la caractérisation précise de voies de signalisations par différentes approches (cytométrie en flux, siRNA, WB, PCR...). Nous avons également établi un modèle d'induction de stress RE dans des cardiomyocytes adultes isolés à partir de cœur de rats. Ce modèle est plus pertinent pour étudier la physiologie du cardiomyocyte *in vitro* par rapport à la lignée H9c2, mais possède néanmoins des contraintes importantes (protocole de dissociation complexe, temps de maintien en culture relativement court...). Enfin, nous avons utilisé le modèle *in vivo* d'induction de stress RE par injection de TN décrit dans la première partie des résultats.

## I. Etude du rôle de SIRT1 dans la réponse apoptotique au stress RE

### A. Etablissement du modèle d'étude du stress RE dans les cellules H9c2

Afin d'induire un stress RE dans les cellules H9c2, nous avons utilisé deux drogues reconnues comme inducteurs de stress RE, la thapsigargine (TG) et la tunicamycine (TN). La thapsigargine est un inhibiteur non compétitif de l'ATPase SERCA. L'inhibition de cette pompe provoque le blocage de la recapture du calcium du cytoplasme vers le RE. Les fuites calciques du RE ne sont alors plus compensées et la concentration intraluminale de calcium dans le RE est modifiée (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). Cette perturbation de l'homéostasie calcique modifie le fonctionnement de protéines chaperonnes du RE dont l'activité est dépendante du calcium, telles que la calnexine ou la calreticuline, ce qui altère le processus de repliement des protéines du RE. Cette altération provoque l'accumulation de protéines mal repliées et donc un stress RE. Nous avons également utilisé la tunicamycine, dont l'action a déjà été décrite dans la première partie des résultats. TG et TN vont donc induire une perturbation de la maturation des protéines et l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE en agissant sur des processus différents, dépendants ou non du calcium. L'utilisation en parallèle de ces deux drogues nous a permis d'associer les résultats obtenus à la perturbation de la synthèse des protéines de manière générale et non aux propriétés spécifiques de l'une ou l'autre de ces drogues. Notre objectif étant de développer un modèle de stress RE délétère associé à un déclenchement de la mort cellulaire, j'ai effectué des cinétiques et des effets-doses puis mesuré la mort cellulaire grâce au test FDA (Fluoresceine DiAcetate). Le groupement diacétate rend le FDA perméant et bloque la fluorescence de la fluorescéine. Lorsque le FDA pénètre dans la cellule, les estérases cellulaires clivent cette molécule, libérant ainsi la fluorescéine et la cellule devient alors fluorescente. Dans les cellules mortes, les estérases n'étant plus actives, les cellules n'émettent pas de fluorescence.



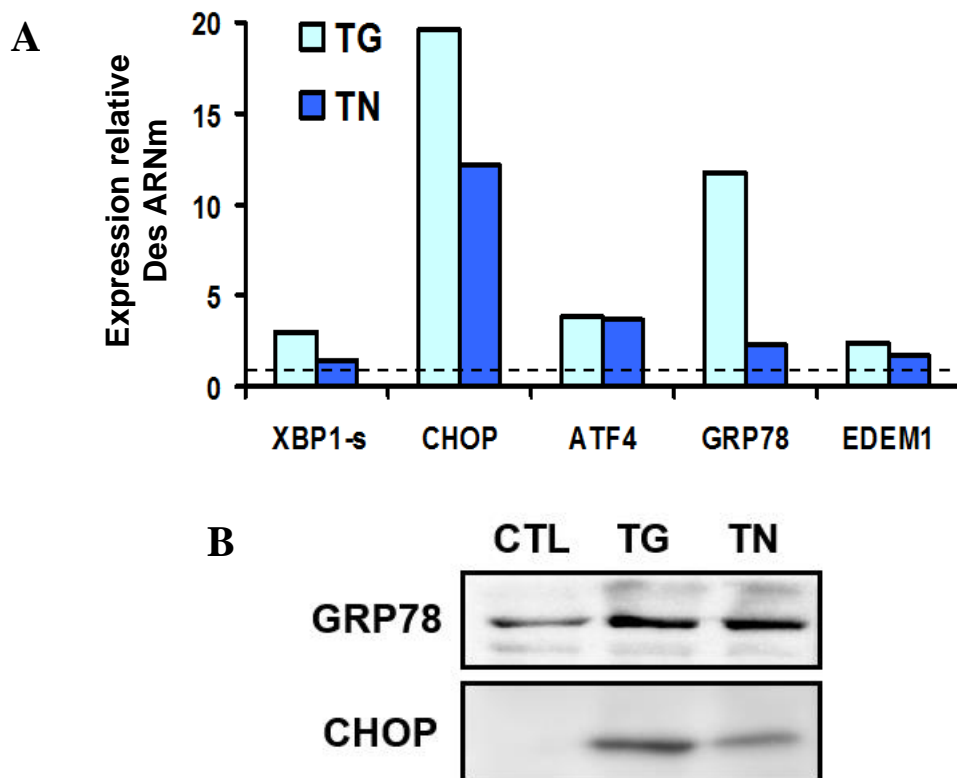
**Figure 46 : Etude de la mort cellulaire induite par TN (A) et TG (B).** TG et TN induisent la mort cellulaire de manière dose et temps dépendants. TG = thapsigargine, TN = tunicamycine, CTL: contrôle.

Après un traitement avec TN (figure 46A) ou TG (figure 46B), la mort cellulaire augmente progressivement au cours du temps. De même, la mortalité augmente en fonction de la dose de TN ou de TG. Ainsi, TN et TG induisent la mort cellulaire des cellules cardiaques de manière dose et temps dépendants. Pour la suite de nos expériences, nous avons choisi des conditions dans lesquelles le taux de mort cellulaire est d'environ 50%, de manière à pouvoir moduler positivement ou négativement cette mort. Nous avons donc retenu les doses de 10 µg/ml pour la tunicamycine et 5µM pour la thapsigargine et un traitement d'une durée de 48h.

Afin de vérifier que ces conditions de traitement sont associées à l'induction d'un stress RE, nous avons mesuré l'expression de marqueurs de stress RE des trois branches de la voie UPR par RT-PCRq et WB. Nous pouvons observer qu'en réponse à TG et TN,

l'expression des ARNm d'ATF4, de CHOP, de XBP1s et de EDEM1 (figure 47A) et le niveau protéique de GRP78 et de CHOP sont fortement augmentés (figure 47B). Cette observation confirme que dans les conditions expérimentales choisies, TG et TN induisent un stress RE important.

En conclusion, les conditions expérimentales que nous avons développées nous permettent donc d'induire un stress RE délétère aboutissant à la mort des cellules cardiaques H9c2.



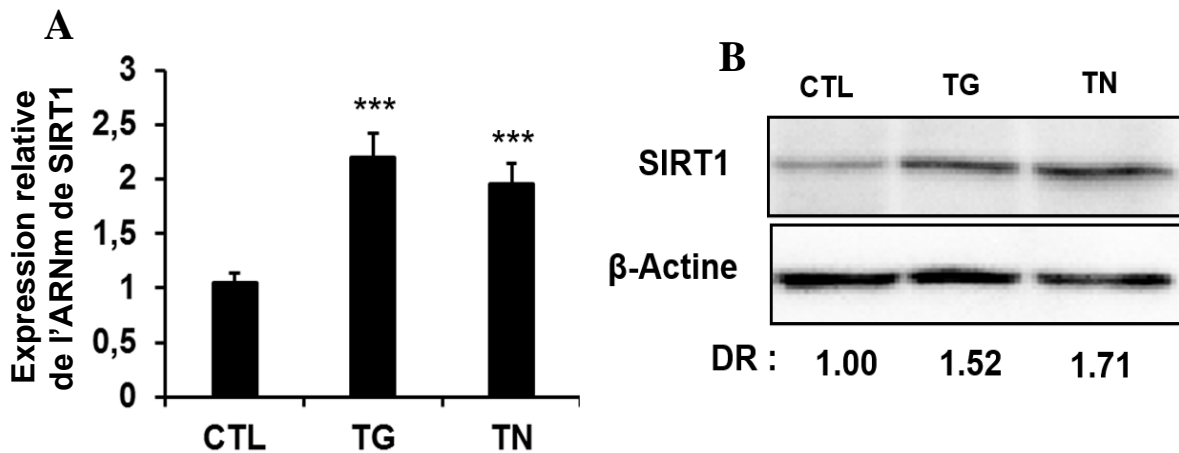
**Figure 47 : Mesure de l'expression de membres de la voie UPR en réponse à TG et TN. (A)** Les ARNm de XBP1s, CHOP, ATF4, GRP78 et EDEM1 sont augmentés en réponse à TG et TN. **(B)** L'expression de GRP78 et de CHOP est augmentée en réponse aux agents de stress RE. CTL: contrôle.

## B. Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1 en réponse au stress RE

SIRT1 est une protéine connue pour être activée en réponse à différents types de stress et induire des réponses protectrices pour rétablir l'homéostasie. Afin de déterminer l'implication de SIRT1 dans la réponse au stress RE, j'ai mesuré son expression par RT-PCRq et par western blot en présence ou en absence de TG et TN. Comme nous pouvons le voir sur la



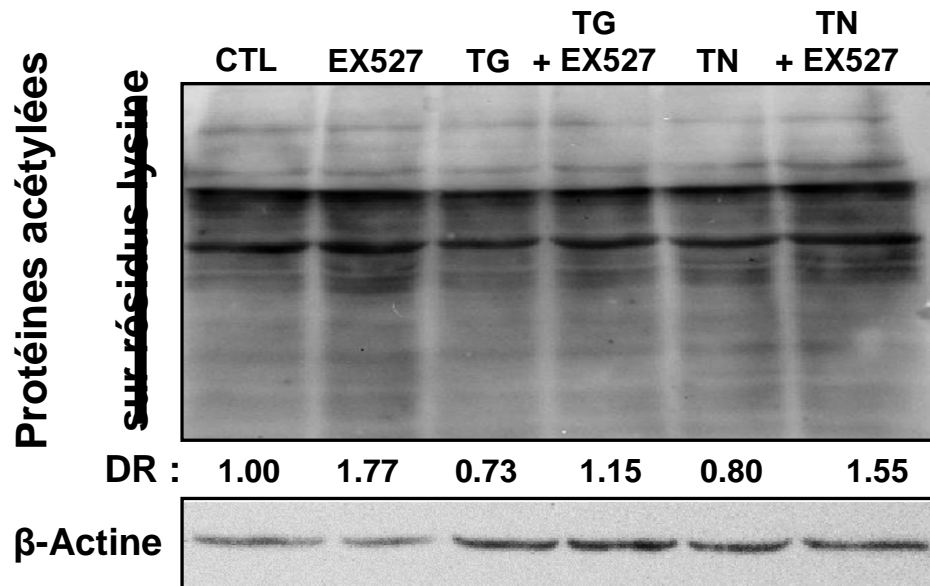
figure 48, le stress RE induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm (A) et de la protéine SIRT1 (B).



**Figure 48 : Régulation de l'expression de SIRT1 en réponse au stress RE.**

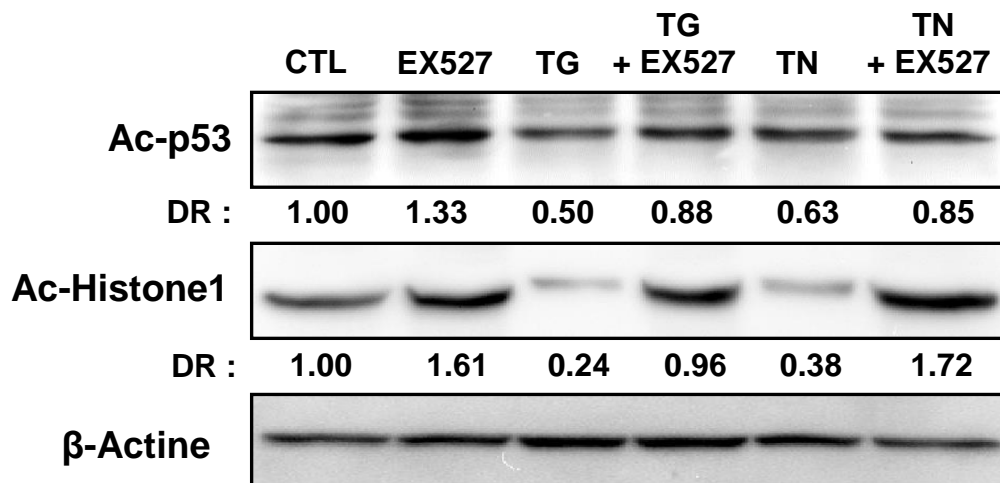
TG et TN (4h) induisent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm (A) et du niveau protéique de SIRT1 (B). CTL: contrôle. DR : Densité Relative.

Nous nous sommes demandé si cette augmentation de l'expression de SIRT1 était accompagnée d'une augmentation de son activité. Pour mesurer l'activité déacétylase de SIRT1, nous avons mesuré l'acétylation générale des protéines sur des résidus lysines. Nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de SIRT1, l'EX527, décrit dans la littérature comme spécifique de cette sirtuine (Peck, Chen et al. 2010). De manière attendue, l'inhibition de l'activité déacétylase de SIRT1 par l'inhibiteur pharmacologique EX527 (10μM), augmente l'acétylation générale des protéines sur des résidus lysines (figure 49). Le stress RE induit par TG et TN entraîne une diminution de l'acétylation des protéines. En présence d'agents des stress RE et d'EX527, l'acétylation des résidus lysines est augmentée, ce qui suggère que la déacétylation des protéines en réponse au stress RE est dépendante de SIRT1.



**Figure 49 :** Acétylation globale des protéines sur des résidus lysine en réponse au stress RE. L'inhibition de SIRT1 par l'EX527 (10 $\mu$ M) augmente l'acétylation des protéines. Le stress RE induit par TG et TN (4h) diminue l'acétylation des résidus lysine, cette diminution est bloquée lorsque SIRT1 est inhibée. CTL: contrôle. DR : Densité Relative.

Afin de mieux caractériser l'activité de SIRT1 en réponse au stress RE, nous avons mesuré l'acétylation de deux cibles reconnues de SIRT1, p53 et l'histone 1 (H1) (Luo, Nikolaev et al. 2001, Vaquero, Scher et al. 2004).



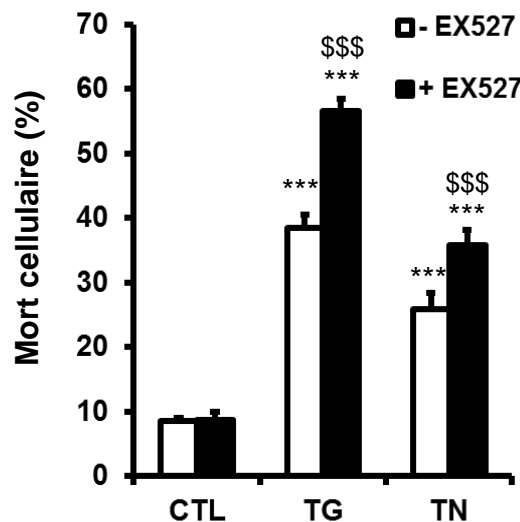
**Figure 50 :** Acétylation de p53 et de l'histone H1 en réponse au stress RE.

L'inhibition de SIRT1 par l'EX527 (10 $\mu$ M) augmente l'acétylation de p53 et de l'histone H1. Le stress RE induit par TG et TN (4h) diminue l'acétylation de ces protéines ; cette diminution est bloquée lorsque SIRT1 est inhibée par l'EX527. CTL : contrôle. DR = Densité relative.

Nous pouvons observer sur la figure 50 que TG et TN induisent une forte diminution de l'acétylation de ces deux protéines traduisant une activation de SIRT1 en réponse au stress RE. L'EX527 augmente l'acétylation de l'histone H1 et de p53 et bloque la déacétylation induite par le stress RE. Ces résultats démontrent donc que SIRT1 est spécifiquement activée en réponse au stress RE.

### C. Rôle de SIRT1 dans la réponse apoptotique au stress RE délétère des cellules cardiaques

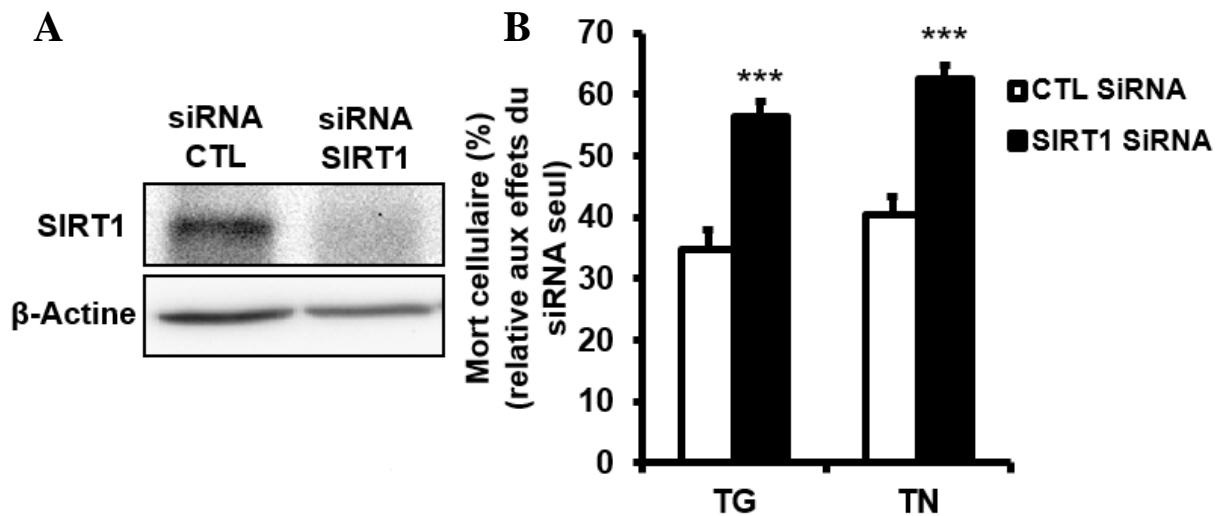
Un stress RE sévère ou prolongé est considéré comme délétère car associé au déclenchement de la mort cellulaire dans de nombreux systèmes (Sano and Reed 2013). Puisque nous avons démontré que SIRT1 est activée en réponse au stress RE, nous avons déterminé si cette sirtuine régule la mort cellulaire induite par un stress RE délétère. La mort cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant la sonde FDA (figure 51).



**Figure 51 : Rôle de SIRT1 dans la mort cellulaire induite par un stress RE.**

*TG et TN induisent une augmentation importante de la mort cellulaire. Cette mort est augmentée lorsque SIRT1 est inhibée par l'EX527 (10 $\mu$ M). CTL: contrôle.*

Les cellules non traitées présentent un faible taux de mort cellulaire (moins de 10%). En réponse au stress RE, on observe une augmentation de la mort cellulaire qui atteint environ 38% avec TG et 26% avec TN. De manière intéressante, alors que l'EX527 seul n'a aucun effet, il augmente la mort cellulaire induite par TG et TN. Même si l'EX527 est décrit comme très spécifique de SIRT1, nous avons choisi de confirmer ces résultats en inhibant l'expression de SIRT1 par SiRNA.



**Figure 52 : Effet de l'extinction de SIRT1 sur la mort cellulaire induite par un stress RE.**

(A) Après transfection du siRNA SIRT1, cette protéine n'est plus détectable. (B) En réponse au stress RE, l'extinction de SIRT1 augmente la mort cellulaire. CTL: contrôle.

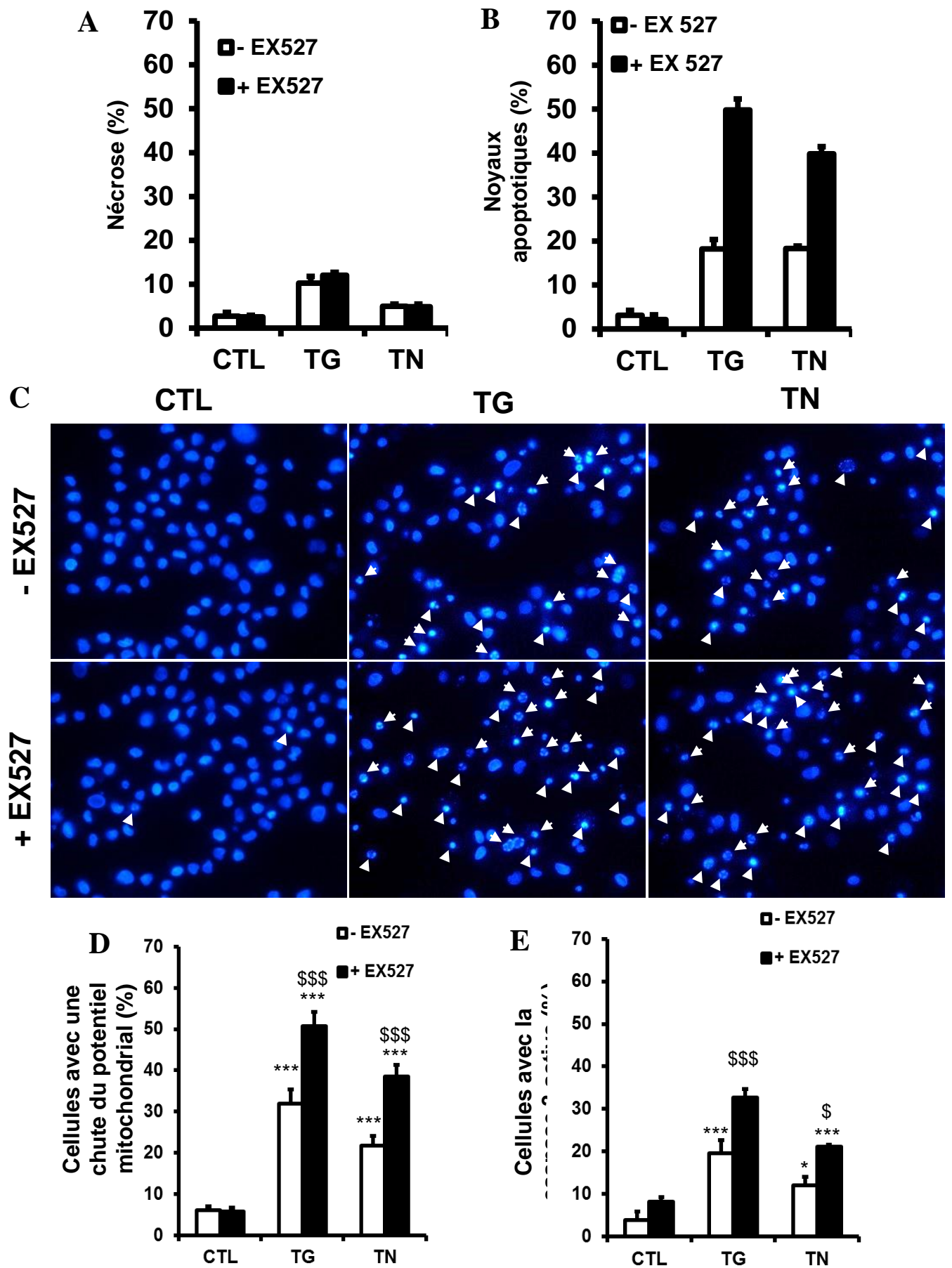
Nous pouvons observer qu'après 24h de transfection avec le SiRNA SIRT1, la protéine n'est plus détectable (figure 52A). Nous avons donc transfecté les cellules H9c2 avec un siRNA CTL ou un siRNA SIRT1 puis 24h après, les cellules ont été traitées avec TG et TN. L'extinction de SIRT1 induit une augmentation de la mort cellulaire en réponse au stress RE (figure 52B), ce qui valide les résultats obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'inhibition ou l'extinction de SIRT1 augmente la mort cellulaire en réponse à TG ou TN. Nous pouvons donc conclure que SIRT1 protège de la mort cellulaire induite par le stress RE.

## D. Caractérisation de la mort cellulaire régulée par SIRT1 en réponse au stress RE

Pour caractériser la mort cellulaire régulée par SIRT1 en réponse au stress RE, j'ai mesuré :

- la nécrose par cytométrie en flux en utilisant l'iodure de propidium, un agent intercalant qui se fixe aux acides nucléiques doubles brins. Cette molécule fluorescente imperméante marque les cellules présentant une perméabilisation de la membrane plasmique, une caractéristique de la mort cellulaire par nécrose.
- l'apoptose, en étudiant la morphologie des noyaux après marquage avec la sonde Hoechst, qui se fixe dans le grand sillon de l'ADN.
- l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, en utilisant la sonde DiOC6(3), un cation lipophile fluorescent perméant qui s'accumule dans les compartiments avec un potentiel de membrane négatif. Utilisée à faible concentration (de l'ordre du nM), elle permet de marquer spécifiquement les mitochondries polarisées.
- l'activation de la caspase-3 mesurée grâce à la sonde DEVD-NucView 488 qui est clivée par les caspases-3 actives en un produit fluorescent.

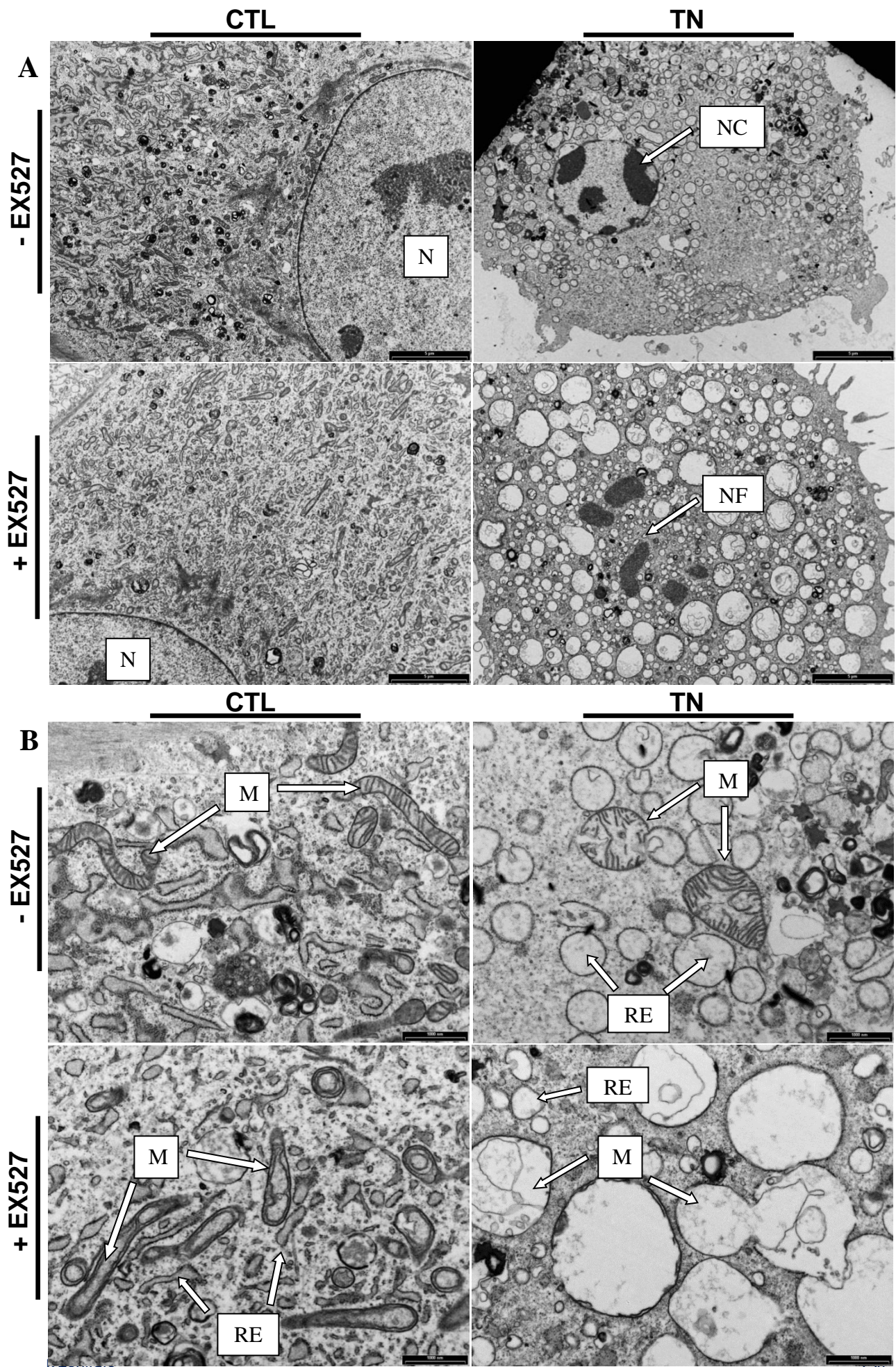


**Figure 53 : Caractérisation de la mort cellulaire régulée par SIRT1 en réponse au stress RE.** L'inhibition de SIRT1 par EX527 (10 $\mu$ M) ne s'accompagne pas d'une augmentation de la nécrose en réponse à TG et TN (A). En revanche l'inhibition de SIRT1 augmente la fragmentation nucléaire (B, C), la chute de potentiel de membrane mitochondrial (D) et l'activation de la caspase 3 (E). CTL : contrôle.

L'augmentation du pourcentage de cellules positives pour l'iodure de propidium reste très faible après le traitement par TG et TN et n'est pas modifié par l'EX527 (figure 53A). Ceci indique que les cellules ne meurent pas par nécrose. Nous pouvons observer sur la figure 53C que le stress RE induit la condensation et la fragmentation des noyaux, des caractéristiques de la mort par apoptose. De plus, le nombre de cellules présentant un noyau apoptotique est augmenté lorsque SIRT1 est inhibée (figure 53C). Puisque la mort cellulaire induite par le stress RE et l'inhibition de SIRT1 est de type apoptotique, nous avons étudié l'implication de la voie mitochondriale de l'apoptose et l'activation de la caspase 3. Les résultats obtenus indiquent que le stress RE induit une chute du potentiel de membrane mitochondrial (figure 53D) et une activation de la caspase 3 (figure 53E). L'inhibition de SIRT1 par l'EX527 augmente la dépolarisation des mitochondries et l'activation de la caspase 3 en réponse au stress RE.

Pour étudier plus en détails l'apoptose et les modifications de l'ultrastructure cellulaire induite par le stress RE et l'inhibition de SIRT1, les cellules H9c2 ont été fixées après 36h de traitement par TN en présence ou en absence d'EX527, puis observées par microscopie électronique.







**Figure 54 : Observation par MET de l'architecture cellulaire en réponse au stress RE et à l'inhibition de SIRT1.** Le stress RE induit un gonflement du RE et des mitochondries et une condensation des noyaux. Lorsque SIRT1 est inhibée, le gonflement du RE est plus important, les mitochondries sont dépourvues de crêtes et les noyaux sont fragmentés. Grossissement X3000 (A) ou X15000 (B). RE : Réticulum endoplasmique, M : mitochondrie, N : Noyau, NC : Noyau Condensé, NF : Noyau Fragmenté, CTL : Contrôle.

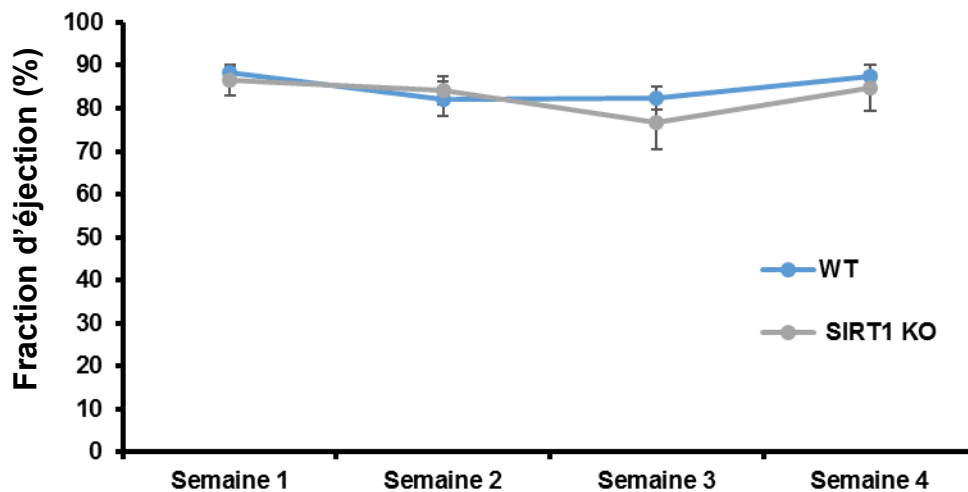
Les cellules non traitées présentent une architecture cellulaire normale avec des mitochondries de forme allongée présentant un nombre important de crêtes mitochondriales, un réticulum endoplasmique fin et allongé, ainsi que des noyaux de forme classique (figure 54). Le traitement avec TN induit un gonflement du RE et des mitochondries, qui conservent malgré tout des crêtes, ainsi qu'une condensation nucléaire caractéristique de l'apoptose. La combinaison TN et EX527 provoque un gonflement plus important du RE, les mitochondries apparaissent complètement dilatées et dépourvues de crêtes et ne sont donc plus fonctionnelles, le noyau apparaît condensé et fragmenté. L'inhibition de SIRT1 modifie donc dramatiquement la structure du RE et des mitochondries et aggrave l'effet délétère du stress RE.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus *in vitro* indiquent qu'une inhibition de SIRT1 augmente l'apoptose mitochondriale induite par TG et TN et démontrent donc que SIRT1 joue un rôle protecteur contre le stress RE dans les cellules cardiaques.

## E. Etablissement du modèle murin d'invalidation conditionnelle de SIRT1

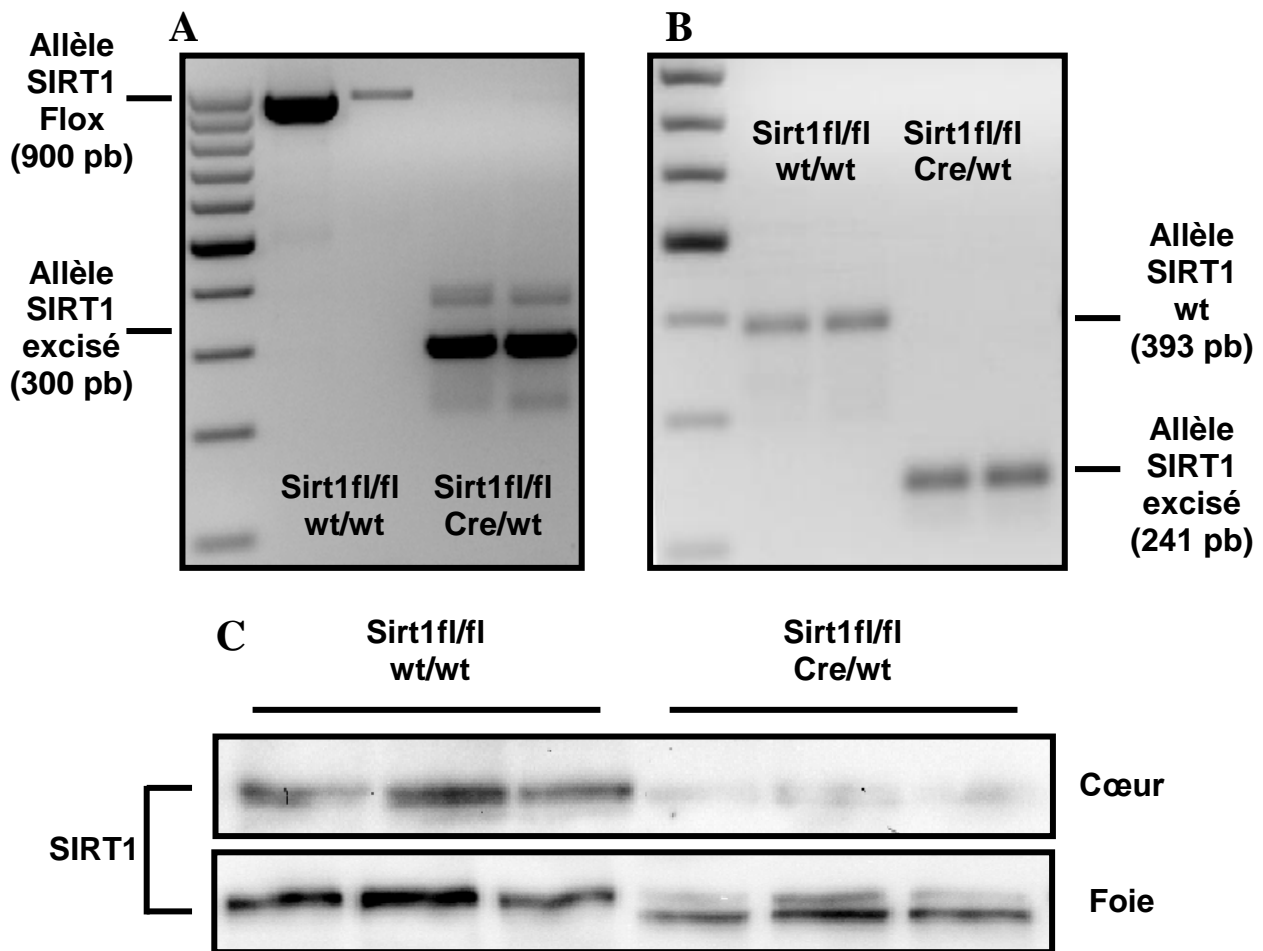
Pour étudier le rôle de SIRT1 dans le modèle *in vivo* de stress RE décrit dans la première partie des résultats, nous avons utilisé une lignée de souris permettant l'inactivation de la sirtuine 1 de manière inductible (fournie par le Dr David Sinclair de l'université d'Harvard, Boston). Cette lignée présente de part et d'autre de l'exon 4 de SIRT1, correspondant au domaine catalytique de la protéine, deux séquences de type LoxP. Ces sites peuvent être reconnus par une Cre recombinase qui entraîne l'excision de la séquence encadrée par les sites LoxP. Nous avons donc croisé les souris SIRT1<sup>Δex4/Δex4</sup> avec des souris transgéniques portant le gène codant la Cre recombinase, dont l'expression est sous le contrôle du tamoxifène (Cre-ERT2). Nous avons ainsi obtenus des souris SIRT1<sup>Δex4/Δex4 ; wt/creERT2</sup>, dont l'activité déacétylase de SIRT1 peut être invalidée de manière inductible par

injection intrapéritonéale de tamoxifène. En accord avec la littérature, nous avons déterminé la quantité de tamoxifène administrée à 100mg/kg répartie en 4 injections journalières. Il a été rapporté dans la littérature que l'activation de certaines Cre recombinase, pouvait induire une dysfonction cardiaque précoce, compensée en quelques semaines. Nous avons donc effectué un suivi de la fonction cardiaque par échocardiographie 1, 2, 3 et 4 semaines après les injections de tamoxifène (figure 55).



**Figure 55 : Effet de l'activation de la Cre recombinase et de l'inactivation de SIRT1 sur la fonction cardiaque.** L'activation de la Cre recombinase et l'inactivation de SIRT1 n'induisent aucune atteinte de la fonction cardiaque.

Nous pouvons observer une légère diminution de la fraction d'éjection après trois semaines, rétablie à un niveau normal à quatre semaines. Nous avons donc choisi d'étudier les effets de l'inactivation de SIRT1, quatre semaines après l'injection de tamoxifène pour la suite de nos expérimentations. Après le sacrifice des souris, nous avons collecté différents organes pour vérifier l'inactivation de SIRT1 au niveau ADN (figure 56A), ARNm (figure 56B) et protéique (figure 56C).



**Figure 56 : Effet de l'activation de la Cre recombinase sur l'ADN, l'ARNm et la protéine SIRT1 en réponse au tamoxifène.**

L'activation de la Cre recombinase par le tamoxifène entraîne l'excision de l'exon 4 du gène de SIRT1 (ADN obtenu à partir de la queue des souris)(A), l'expression d'un ARNm de SIRT1 tronqué (ARNm obtenus à partir du ventricule gauche des souris)(B), l'extinction quasi totale de la protéine SIRT1 dans le cœur et l'expression d'une forme tronquée de la protéine dans le foie (C).

L'activation de la Cre recombinase permet l'excision de l'exon 4 du gène de SIRT1 (figure 58). Cette excision entraîne l'expression d'une forme tronquée de l'ARNm de SIRT1 (figure 59). Finalement, l'injection de tamoxifène induit l'extinction quasi totale de la protéine dans le cœur (figure 60). Il est à noter que dans le foie, l'activation de la Cre recombinase induit l'expression d'une forme tronquée de SIRT1, qui pourrait correspondre à

une forme clivée et non active de SIRT1 produite par l'excision de l'exon 4. Ces résultats valident notre modèle d'inactivation conditionnelle de SIRT1.

## F. Rôle de SIRT1 dans la régulation du stress RE *in vivo*

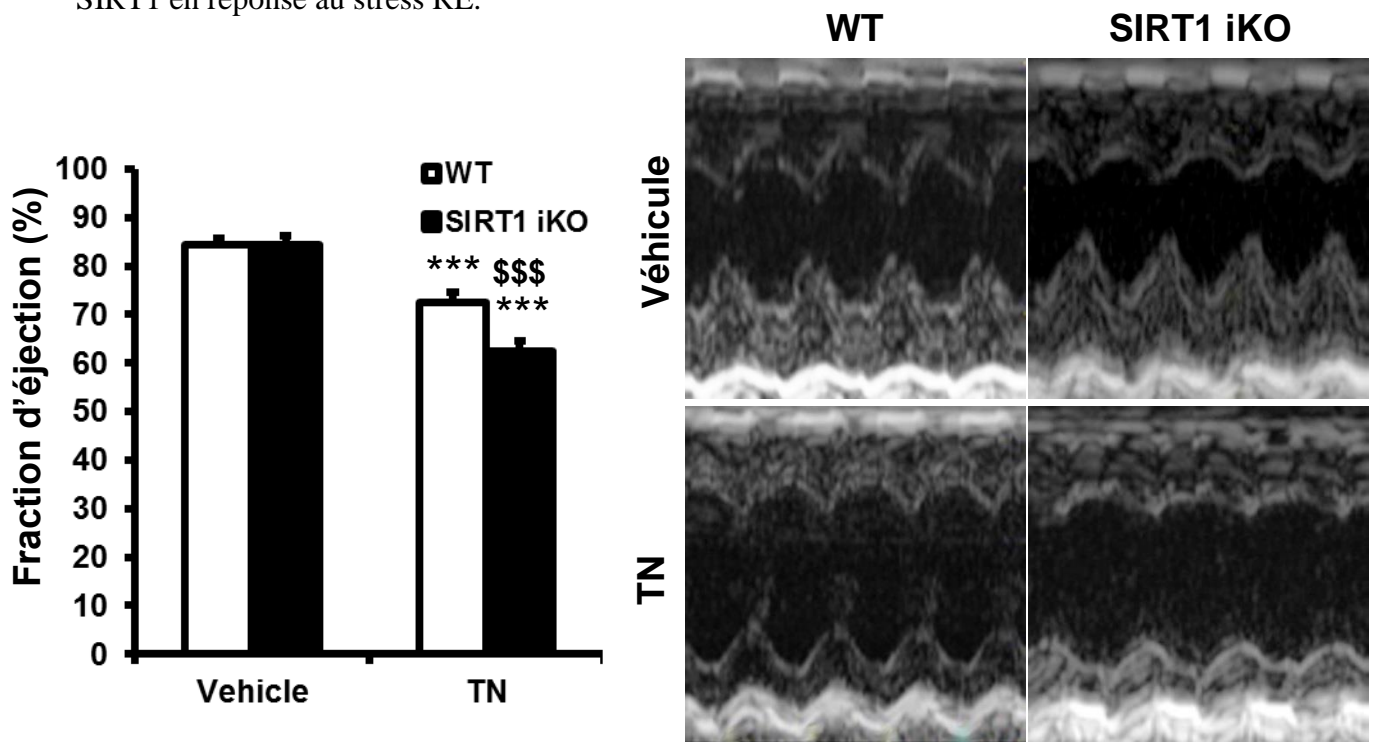
Les résultats obtenus *in vitro* nous ont conduits à étudier le rôle de SIRT1 dans la réponse au stress RE *in vivo* chez la souris. Pour cela nous avons utilisé les souris SIRT1 <sup>$\Delta$ ex4/ $\Delta$ ex4 ; wt/creERT2</sup>, chez lesquelles SIRT1 est invalidée par injection de tamoxifène. Quatre semaines après l'injection de tamoxifène, les souris ont été injectées avec la tunicamycine (2mg/kg) pour induire un stress RE. La fonction cardiaque a été mesurée par échocardiographie après 72h de traitement (figure 61), puis les souris ont été sacrifiées et une étude anatomique a été réalisée (tableau 7).

	WT CTL	SIRT1 iKO CTL	WT TN	SIRT1 iKO TN
<b>Poids initial (g)</b>	30 $\pm$ 0.45	28.55 $\pm$ 0.38	30.7 $\pm$ 0.54	29.5 $\pm$ 0.70
<b>Poids final (g)</b>	29.03 $\pm$ 0.52	27.94 $\pm$ 0.54	26.03 $\pm$ 0.61***	24.27 $\pm$ 0.75***
<b>Perte de poids (g)</b>	0.97 $\pm$ 0.25	0.61 $\pm$ 0.42	4.67 $\pm$ 0.55***	5.23 $\pm$ 0.31***
<b>Longueur du Tibia (cm)</b>	1.86 $\pm$ 0.04	1.86 $\pm$ 0.01	1.84 $\pm$ 0.02	1.85 $\pm$ 0.01
<b>Poids du cœur / poids total</b>	6.35 $\pm$ 0.19	6.44 $\pm$ 0.16	6.28 $\pm$ 0.18	6.74 $\pm$ 0.36
<b>Poids du poumon / poids total</b>	6.85 $\pm$ 0.19	7.89 $\pm$ 1.52	7.05 $\pm$ 0.33	7.41 $\pm$ 0.21
<b>Poids du foie / poids total</b>	54.80 $\pm$ 0.87	51.43 $\pm$ 1.13	45.39 $\pm$ 1.17***	44.26 $\pm$ 0.92***
<b>Poids du rein / poids total</b>	7.38 $\pm$ 0.16	7.05 $\pm$ 0.20	8.13 $\pm$ 0.32	7.76 $\pm$ 0.34

**Tableau 7 : Données anatomiques des souris invalidées pour SIRT1 et traitées avec TN (2mg/kg) pendant 72h. n = 10 souris par groupe.**

Comme nous l'avons vu dans la première partie des résultats, le tableau 7 montre que le stress RE entraîne une diminution du poids des souris et du poids relatif du foie. Ces pertes

de poids ne sont pas modulées par l'inactivation de SIRT1. En ce qui concerne la fonction cardiaque, nous pouvons observer dans la figure 57 que le traitement par TN induit une diminution significative de la fraction d'éjection systolique et de la fraction de raccourcissement, sans induire de modification du diamètre du VG, de l'épaisseur des parois ventriculaires ou du rythme cardiaque (tableau 8). Alors que l'inactivation de SIRT1 en elle-même n'induit aucune perturbation de la fonction cardiaque, l'altération des fractions d'éjection systolique et de raccourcissement est plus importante en réponse au stress RE lorsque SIRT1 est invalidée. De plus, en réponse à TN, le diamètre et l'épaisseur des parois du VG sont significativement plus importantes chez les souris invalidées pour SIRT1 que chez les souris sauvages. L'altération de la fonction cardiaque est donc plus importante chez les souris invalidées pour SIRT1, ce qui démontre *in vivo* le rôle cardioprotecteur joué par SIRT1 en réponse au stress RE.



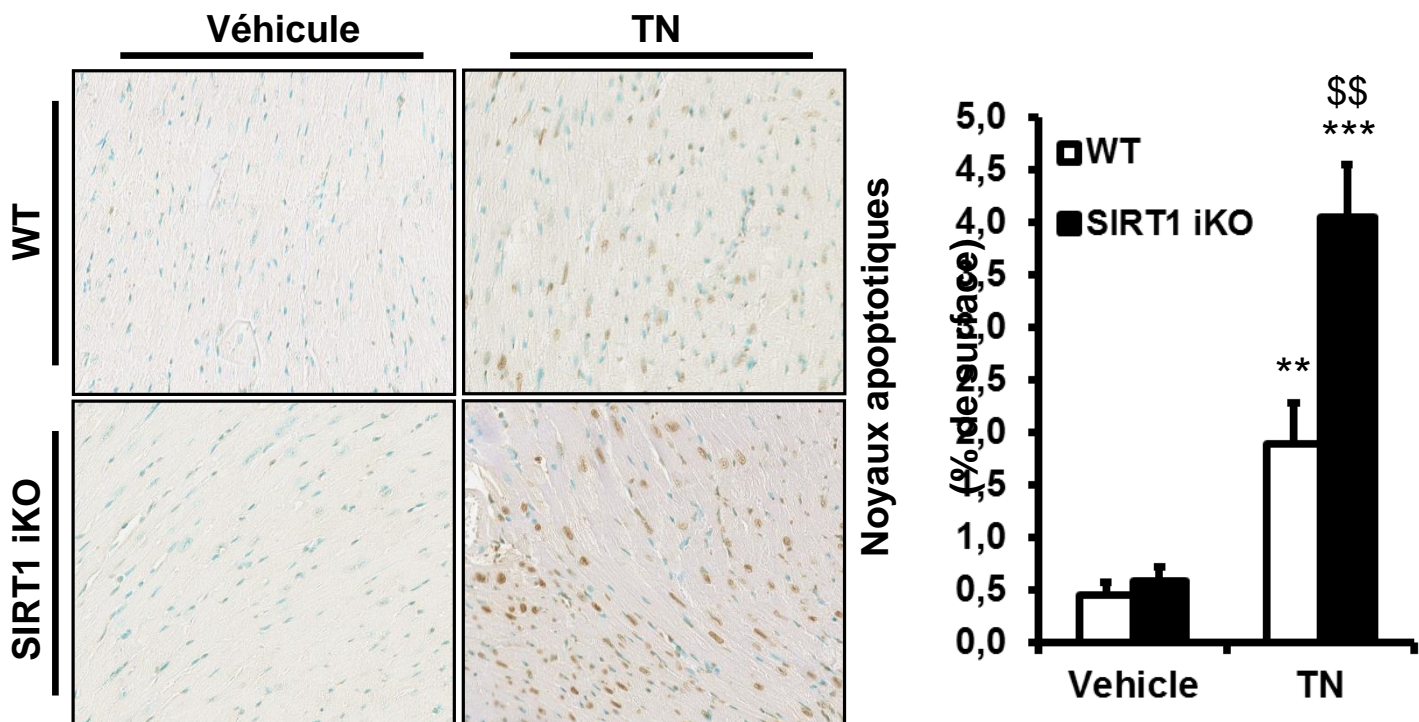
**Figure 57 : Effet de l'injection de TN et de l'invalidation de SIRT1 sur la fonction cardiaque.** Le stress RE induit par TN entraîne une diminution de la fraction d'éjection. Cette altération de la fonction cardiaque est plus importante chez les souris invalidées pour SIRT1. CTL: contrôle, WT : sauvages

	WT CTL	SIRT1 iKO CTL	WT TN	SIRT1 iKO TN
Fraction de raccourcissement (%)	47,6 ± 1,3	47,7 ± 1,9	36,1 ± 2,1***	29,7 ± 1,3***\$
Fraction d'éjection systolique (%)	84,5 ± 1,1	84,3 ± 1,9	72,4 ± 2,3***	62,3 ± 2,2***\$\$
Diamètre du VG en mm (diastole)	3,47 ± 0,09	3,59 ± 0,13	3,54 ± 0,15	3,60 ± 0,10
Diamètre du VG en mm (systole)	1,82 ± 0,08	1,90 ± 0,14	2,18 ± 0,16	2,55 ± 0,09***\$
Epaisseur des parois en mm (diastole)	1,98 ± 0,09	2,01 ± 0,08	1,97 ± 0,07	2,14 ± 0,14
Epaisseur des parois en mm (systole)	2,96 ± 0,07	3,01 ± 0,12	2,78 ± 0,10	2,24 ± 0,13***\$
Rythme cardiaque	487 ± 24	489 ± 13	467 ± 17	453 ± 23

Tableau 8 : Fonction cardiaque des souris invalidées pour SIRT1 et traitées avec TN.

VG : Ventricule Gauche, WT : sauvages, CTL = Contrôle. n = 10 souris par groupe.

L'apoptose jouant un rôle important dans les effets délétères du stress RE lors du développement de la pathologie cardiaque, nous avons mesuré la fragmentation des noyaux des cardiomyocytes sur des coupes de cœurs de souris en utilisant un marquage TUNEL.





**Figure 58 : L'apoptose induite par un stress RE est augmentée lorsque SIRT1 est invalidée.**  
 Le marquage TUNEL de coupes de cœur de souris révèle que le stress RE induit une augmentation des noyaux apoptotiques fragmentés (marqués en marron). L'apoptose induite par le stress RE est significativement plus importante chez les souris invalidées pour SIRT1.  
 WT = sauvages, CTL = Contrôle

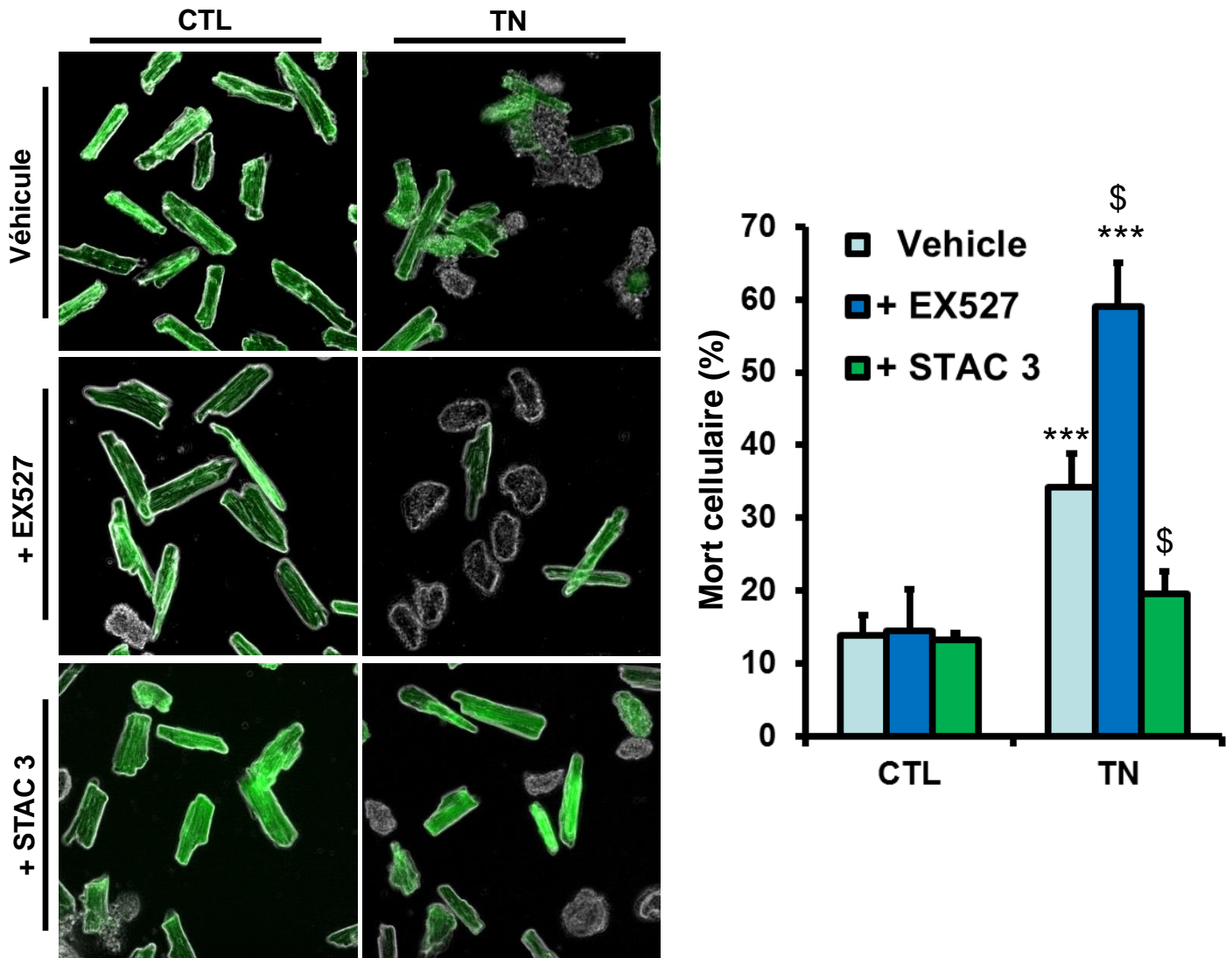
Nous pouvons observer que TN induit une augmentation importante et significative de la mort cellulaire par apoptose (figure 58). De manière intéressante, l'apoptose est plus importante chez les souris invalidées pour SIRT1. Ce résultat indique que SIRT1 joue un rôle cardioprotecteur en limitant l'apoptose induite par le stress RE.

### G. Effet de l'inhibition et de l'activation de SIRT1 dans la réponse au stress RE des cardiomyocytes

Dans notre modèle, la tunicamycine est injectée par voie intrapéritonéale et peut donc induire un stress RE dans différents organes et pas uniquement dans le cœur. Pour vérifier que les effets observés au niveau du cœur sont liés à la capacité de la tunicamycine à induire un stress RE délétère dans les cellules cardiaques, nous avons étudié les effets de TN sur la viabilité cellulaire de cardiomyocytes adultes isolés à partir de cœur de rats, en absence ou en présence d'un inhibiteur (EX527) ou d'un activateur de SIRT1 (STAC3).

Les cardiomyocytes adultes ont été traités avec 10µg/ml de TN pendant 24h, puis nous avons mesuré la mort cellulaire en utilisant le test FDA. La tunicamycine induit une augmentation importante de la mort cellulaire des cardiomyocytes en culture (figure 59), ce qui montre que TN peut cibler directement les cardiomyocytes adultes pour induire un stress RE et l'apoptose. De plus, l'inhibition de SIRT1 par l'EX527 augmente la mort cellulaire en réponse au stress RE, comme nous l'avons observé pour les cellules H9c2. Puisque l'inhibition de SIRT1 augmente l'apoptose induite par le stress RE, nous avons émis l'hypothèse que son activation pouvait être protectrice. Pour tester cette hypothèse, nous avons traité les cardiomyocytes avec du STAC3, un activateur spécifique de SIRT1. De manière très intéressante, un traitement avec le STAC3 protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par TN, ce qui confirme le rôle cardioprotecteur joué par SIRT1 dans la

réponse au stress RE. Ce résultat suggère que l'activation de SIRT1 pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante pour diminuer les effets délétères du stress RE.



**Figure 59 : SIRT1 protège les cardiomyocytes adultes de la mort induite par TN.**

TN induit la mort cellulaire de cardiomyocytes adultes isolés à partir de cœur de rats. L'inhibition de SIRT1 (EX527 20 $\mu$ M) augmente la mort cellulaire induite par un stress RE. L'activation de SIRT1 (STAC3 1 $\mu$ M) protège de la mort cellulaire induite par TN. CTL: contrôle.

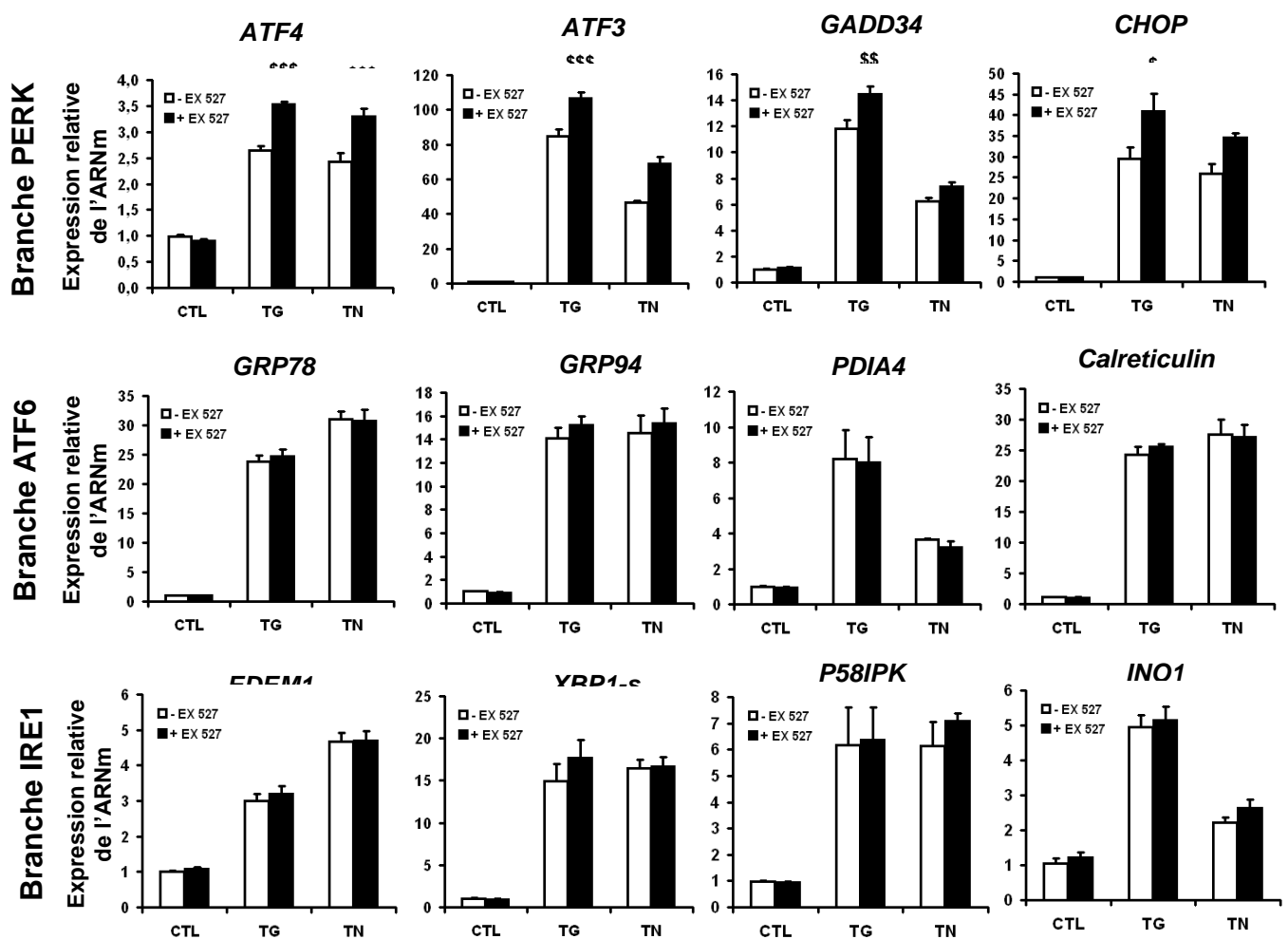
## II. Etude des mécanismes de régulation de la voie UPR par SIRT1

Après avoir démontré *in vitro* et *in vivo* le rôle cardioprotecteur de SIRT1 dans la réponse au stress RE, nous avons cherché à décrypter les mécanismes moléculaires de la régulation du stress RE par cette déacétylase. La réponse UPR est un mécanisme compensatoire qui permet



de rétablir l'homéostasie du RE en réponse à un stress. Dans le cas d'un stress RE trop important ou maintenu sur une durée prolongée, ce mécanisme ne permet plus de rétablir l'homéostasie et la réponse UPR déclenche le processus apoptotique. Puisque nous avons démontré que SIRT1 joue un rôle cardioprotecteur en régulant la mort cellulaire induite par le stress RE, nous avons émis l'hypothèse que SIRT1 agirait en régulant l'activation de la réponse UPR.

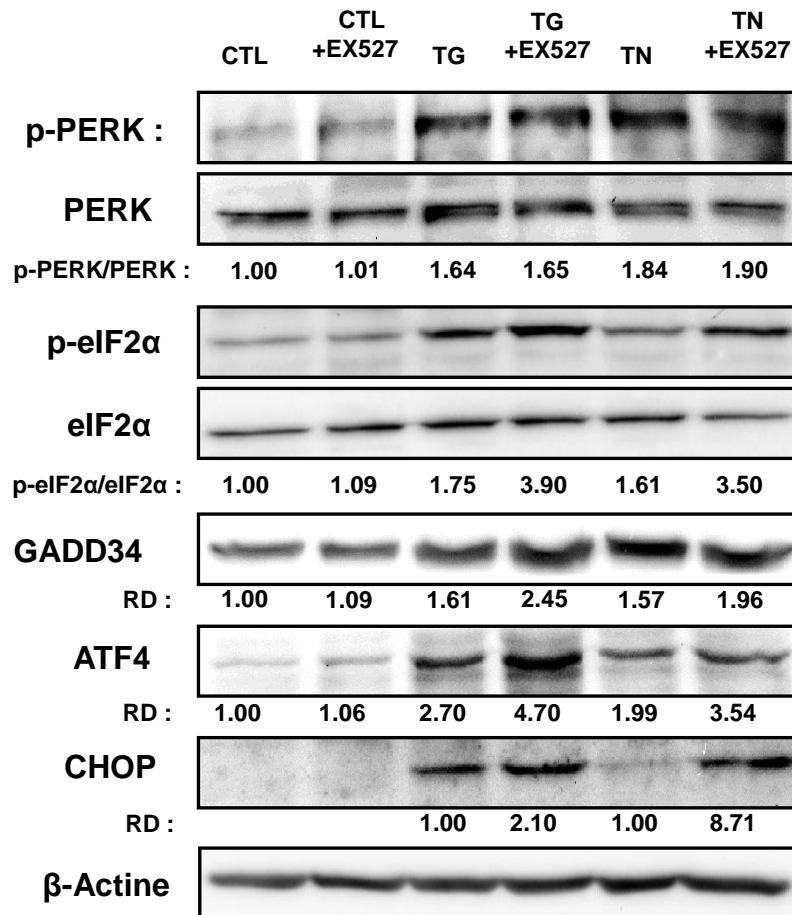
Pour tester cette hypothèse, les cellules H9c2 ont été traitées avec TG et TN pendant 24h, en présence ou en absence de l'inhibiteur de SIRT1 EX527 et l'expression des ARNm des membres des trois branches de la réponse UPR a été mesurée par RT-PCRq.



**Figure 60 : SIRT1 module spécifiquement la branche PERK de la voie UPR.** Le stress RE induit une augmentation de l'expression des membres des 3 branches de la voie UPR. L'inhibition de SIRT1 induit uniquement une augmentation des membres de la branche PERK. CTL: contrôle.

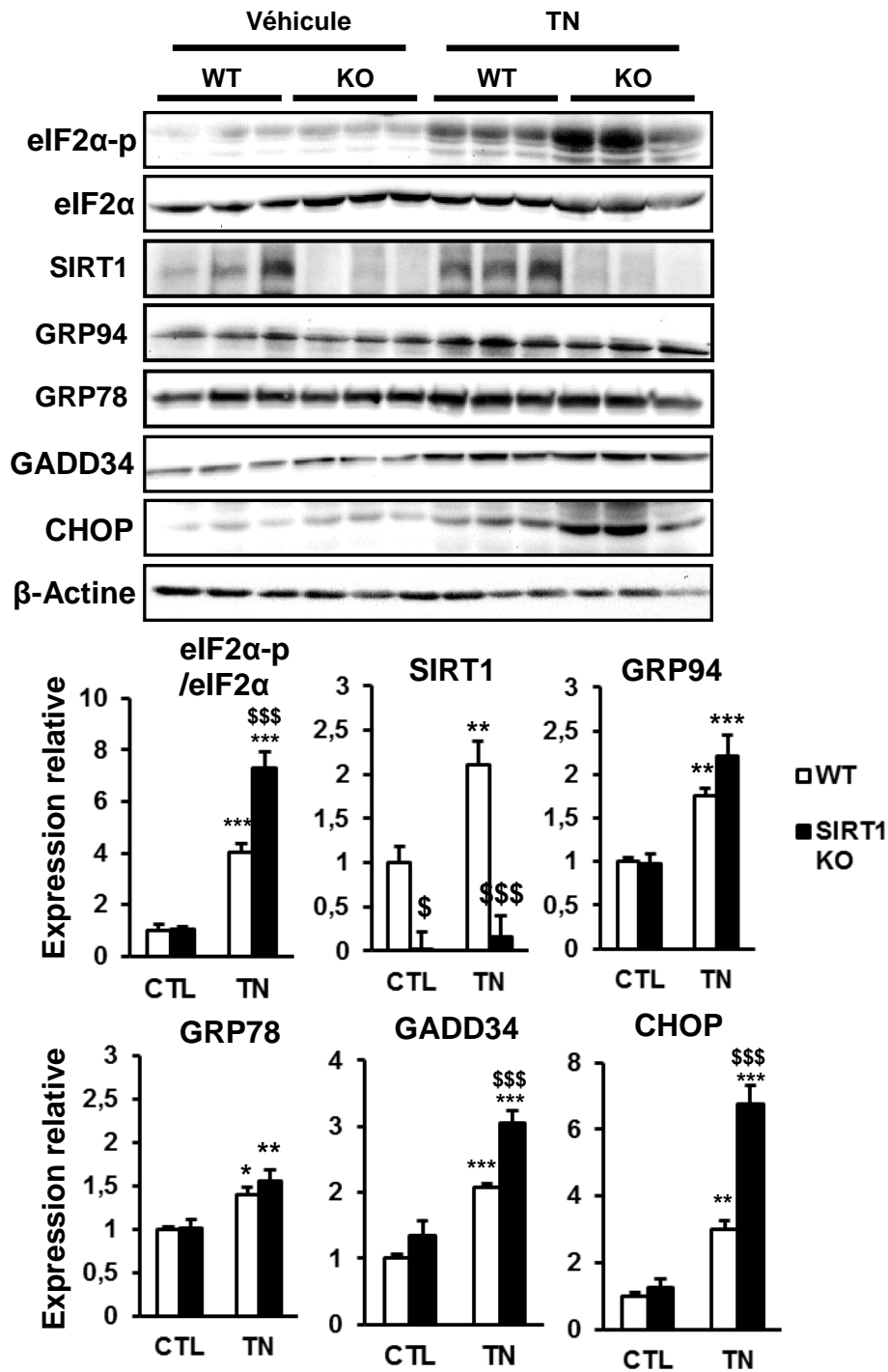
Comme attendu, nous pouvons observer sur la figure 60 que le stress RE induit par TG et TN provoque une augmentation importante de l'expression de tous les gènes de la voie UPR testés, que ce soit des membres de la branche ATF6, IRE1 ou PERK. De plus, alors que l'EX527 seul n'a aucun effet, il induit une augmentation plus importante de l'expression d'ATF4, d'ATF3, de GADD34 et de CHOP en réponse au stress RE. De manière intéressante, nous pouvons remarquer que ces quatre membres font tous partie de la branche PERK de la réponse UPR. Ce résultat suggère que dans les cellules cardiaques, SIRT1 ne module ni la branche ATF6, ni la voie IRE1 mais régule spécifiquement la branche PERK en réponse au stress RE. Pour confirmer ce résultat et puisque l'activation de cette branche est également contrôlée par des modifications post-traductionnelles (notamment la phosphorylation de PERK et d'eIF2 $\alpha$ ), nous avons mesuré par western blot l'effet de l'inhibition de SIRT1 en réponse au stress RE (figure 61).

La première étape d'activation de la branche PERK est la trans-auto-phosphorylation de la kinase PERK (Ron and Walter 2007). Cette phosphorylation de PERK est augmentée en réponse au stress RE, mais n'est pas modulée par l'inhibition de SIRT1, comme le montre la figure 61 suggérant que SIRT1 agit à une étape située en aval de PERK. Une fois activée, la kinase PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (Hetz, Chevet et al. 2013). Cette protéine est phosphorylée en réponse à un traitement par TG et TN et cette phosphorylation est plus importante lorsque SIRT1 est inhibée. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  inhibe la traduction générale des protéines mais stimule de manière spécifique la traduction de protéines non traduites en situation physiologiques telles qu'ATF4, CHOP et GADD34 (Ron and Harding 2012). L'expression de ces trois protéines est effectivement augmentée par TG et TN et là encore, l'inhibition de SIRT1 induit une augmentation plus importante de leur expression.



**Figure 61 : SIRT1 régule la phosphorylation d'eIF2α et l'expression d'ATF4, de GADD34 et de CHOP en réponse au stress RE.** Le stress RE induit par TG et TN provoque l'activation de la branche PERK, caractérisée par la phosphorylation de PERK et d'eIF2α et l'augmentation de l'expression de GADD34, ATF4 et CHOP. L'inhibition de SIRT1 augmente la phosphorylation d'eIF2α, l'expression de GADD34, ATF4 et CHOP en réponse au stress RE. CTL: contrôle, DR : Densité Relative.

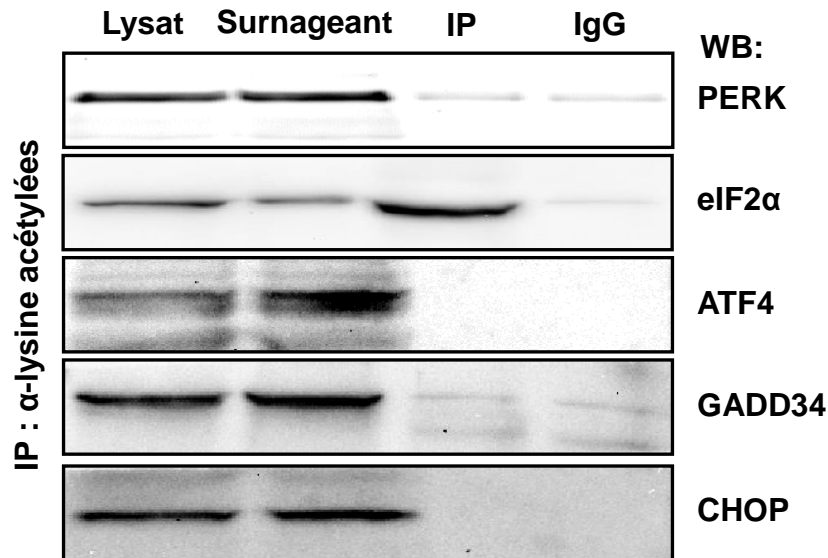
Nous avons ensuite vérifié si les résultats obtenus *in vitro* étaient également observés *in vivo*. Pour cela, en plus de l'expression de SIRT1, nous avons mesuré la phosphorylation d'eIF2α et l'expression de GADD34 et CHOP en réponse au stress RE à partir de lysats de ventricule gauche de souris WT ou SIRT1 iKO traitées pendant 16h par la tunicamycine (figure 62).



**Figure 62 :** L'invalidation de *SIRT1* induit une suractivation de la branche *PERK* en réponse au stress *RE* dans un modèle *in vivo*. *TN* induit la phosphorylation d'eIF2α et l'augmentation de l'expression de *SIRT1*, *GRP78*, *GRP94*, *GADD34* et de *CHOP*. L'expression de *GRP78* et *GRP94* n'est pas modulée par l'invalidation de *SIRT1* en réponse au stress *RE*. L'activation de la branche *PERK* mise évidence par la phosphorylation d'eIF2α et l'expression de *CHOP* et *GADD34* est plus importante chez les souris invalidées pour *SIRT1*.

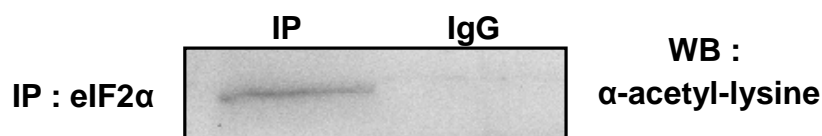
Comme démontré précédemment, la protéine SIRT1 n'est pas détectable chez les souris invalidées pour cette protéine. L'injection de TN induit une augmentation significative de l'expression de SIRT1 chez les souris WT, confirmant les résultats obtenus sur les cellules H9c2 et démontrant que l'expression de cette déacétylase est augmentée *in vivo* en réponse au stress RE. TN provoque l'augmentation de l'expression de GRP78 et de GRP94 de manière identique chez les souris sauvages et chez les souris invalidées pour SIRT1, indiquant que SIRT1 agirait en aval de ces protéines. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'expression de GADD34 et de CHOP sont augmentées par la tunicamycine et l'invalidation de SIRT1 induit une augmentation plus importante de l'expression de ces protéines. Ces résultats confirment *in vivo* que SIRT1 régule la branche PERK de la voie UPR et suggèrent l'existence d'une cible de SIRT1 encore non identifiée dans cette branche.

Afin d'identifier la cible permettant à la déacétylase SIRT1 de réguler la branche PERK, nous avons réalisé une immunoprécipitation (IP) en utilisant un anticorps dirigé contre les résidus lysines acétylés de manière à immunoprécipiter toutes les cibles potentielles de SIRT1. Nous avons ensuite cherché à identifier dans cet immunoprécipitat, la présence des membres de la voie PERK : PERK, eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP et GADD34. En ce qui concerne GADD34, eIF2 $\alpha$  et PERK, qui sont des protéines exprimées de manière importante en situation physiologique, nous avons réalisé cette IP à partir de H9c2 non traitées. En ce qui concerne CHOP et ATF4, exprimées uniquement en réponse au stress RE, l'IP a été réalisée à partir de cellules H9c2 traitées avec TN.



**Figure 63 :** *eIF2α* est une protéine de la voie PERK acétylée sur un ou plusieurs résidus lysine. Parmi les protéines de la branche PERK, seule la protéine *eIF2α* est immunoprécipitée de manière spécifique par l'anticorps  $\alpha$ -lysine acétylées. IP : Immunoprécipitation, SN : surnageant, IgG : Immunoglobuline de type G.

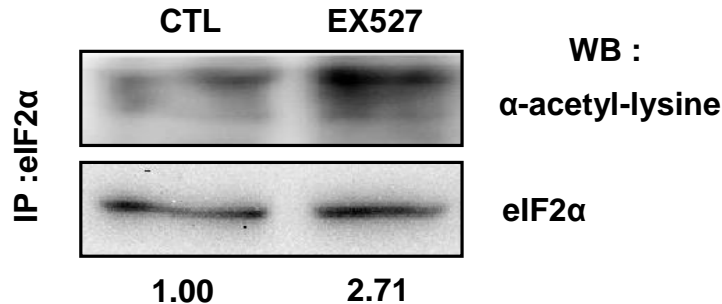
Nous pouvons observer sur la figure 63 qu'une faible bande est détectable pour PERK et GADD34. Cependant, cette bande est également retrouvée avec une intensité identique dans l'immunoprécipitat réalisé avec un anticorps non spécifique (IgG), indiquant que ces bandes sont liées à une immunoprécipitation non spécifique de ces protéines. CHOP et ATF4 ne sont pas détectés dans l'immunoprécipitat. En revanche, *eIF2α* est retrouvée de manière abondante. De plus, après IP, la quantité d'*eIF2α* détectée est plus faible dans le surnageant que dans le lysat cellulaire, ce qui confirme que cette protéine a été immunoprécipitée. Ces observations suggèrent qu'*eIF2α* est acétylée sur un ou plusieurs résidus lysines. Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué l'IP inverse en utilisant un anticorps dirigé contre *eIF2α*, suivi d'un western blot avec l'anticorps dirigé contre les résidus lysines acétylés.



**Figure 64 :** *eIF2α* est acétylée sur un ou plusieurs résidus lysine.

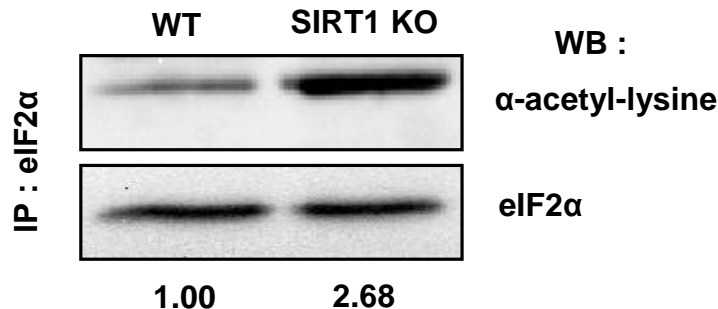
Une bande est détectable de manière spécifique à 38 kDa sur la figure 64, ce qui confirme qu'*eIF2α* est acétylée sur un ou plusieurs résidus lysine et que c'est une cible

potentielle de SIRT1. Pour étudier l'implication de SIRT1 dans la régulation de l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ , nous avons mesuré le niveau d'acétylation de cette protéine en présence ou en absence de l'inhibiteur de SIRT1 EX527 (figure 65).



**Figure 65 : SIRT1 régule l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ .** L'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée lorsque SIRT1 est inhibée ce qui indique que SIRT1 régule l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ .

L'inhibition de SIRT1 induit une augmentation de l'acétylation des résidus lysines d'eIF2 $\alpha$ , ce qui indique que cette acétylation est régulée par SIRT1 et suggère qu'eIF2 $\alpha$  est une cible directe de SIRT1. Pour confirmer ce résultat *in vivo*, nous avons effectué la mesure de l'acétylation des résidus lysines d'eIF2 $\alpha$  à partir d'extraits protéiques de ventricule gauche de souris sauvages et de souris invalidées pour SIRT1 (figure 66).



**Figure 66 : L'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée chez les souris invalidées pour SIRT1.** L'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée chez les souris invalidées pour SIRT1 ce qui indique que SIRT1 régule l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ .

L'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est retrouvée chez les souris sauvages et est augmentée chez les souris invalidées pour SIRT1. Ce résultat confirme qu'eIF2 $\alpha$  est une cible de SIRT1 et que l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est régulée par cette déacétylase *in vivo*.

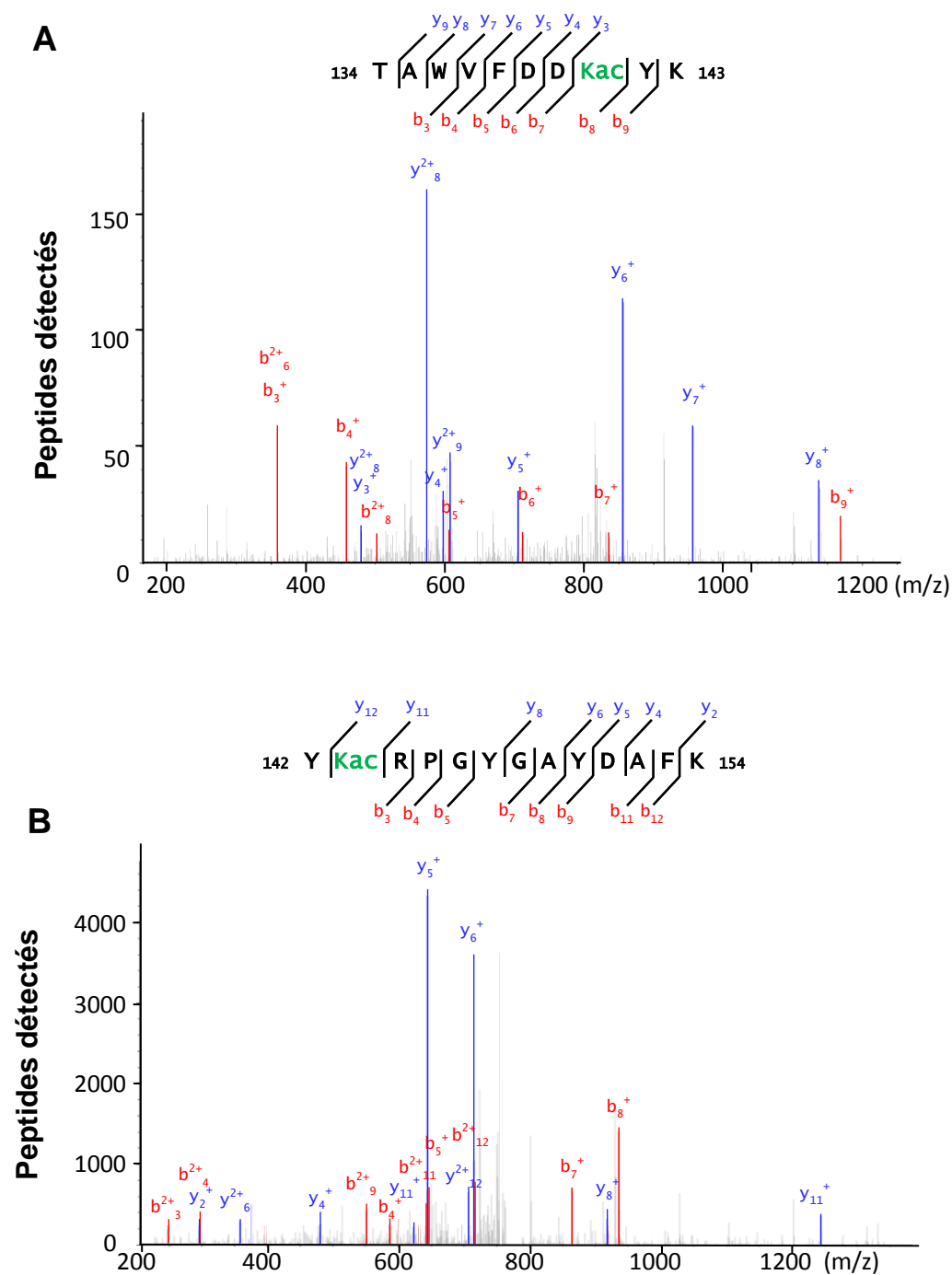


Afin d'identifier les résidus lysines acétylés d'eIF2 $\alpha$  régulés par SIRT1, nous avons réalisé une étude par spectrométrie de masse. Pour identifier l'éventuelle acétylation des résidus lysines d'une protéine, il est nécessaire d'obtenir le plus grand nombre de peptides possibles après digestion de cette protéine, afin d'avoir la plus grande couverture de séquence. Pour cela, il faut analyser la plus grande quantité possible de notre protéine d'intérêt, tout en limitant au maximum les contaminations (kératines, autres protéines,...). Pour obtenir un échantillon enrichi en eIF2 $\alpha$  avec le moins de contaminations possible, nous avons utilisé une approche basée sur une immunoprécipitation en conditions dénaturantes d'eIF2 $\alpha$  à partir de cellules H9c2 suivi d'une migration de l'immunoprécipitat sur gel 1D ou 2D. Les bandes/spots correspondants à eIF2 $\alpha$  sont ensuite récupérés, digérés « in-gel » par la trypsine, puis analysés par spectrométrie de masse.

MPGLSCRFYQ HKFPEVEDVV MVNVR~~S~~IAEM GAYVSLLEYN NIEGMILLSE  
 LSRRRIR~~S~~IN KLIR~~I~~GRNEC VVIRVDKEK GYIDLSKRRV SPEEAIKCED  
 KFTKSKTVYS ILRHVAEVLE YTKDEQLESL FQRTAWVFDD KYKRPGYGAY  
 DAFKHAVSDP SILDSDLNE DEREVLINNI NRRLTPQAVK IRADIEVACY  
 GYEGIDAVKE ALRAGLNCST ETMPIKINLI APPRYVMTT TLERTEGLSV  
 LNQAMAVIKE KIEEKG~~R~~VFN VQMEPKV~~V~~TD TDETELARQL ERLERENAEV  
 DGDDDAEEME AKAED

**Figure 67 : Couverture de séquence d'eIF2 $\alpha$  obtenue lors de l'analyse par spectrométrie de masse.** 26 peptides ont été détectés (représentés en orange), correspondant une couverture de séquence de 86%.

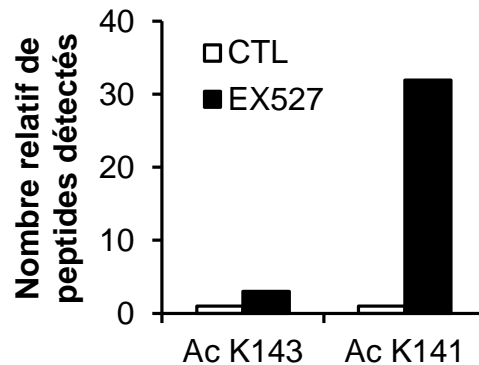
Les peptides d'eIF2 $\alpha$  qui ont pu être analysés par spectrométrie de masse sont représentés dans la figure 67 en orange. La couverture de séquence est très bonne puisque 86% des acides aminés ont été analysés. La trypsine est une protéase qui clive les protéines après des résidus lysine ou arginine. Lorsqu'un résidu lysine est acétylé, ce clivage n'est plus possible. Dans notre analyse, les peptides 134-TAWVFDD~~K~~YK-143 et 142-Y~~K~~RPGYGAYDAFK-154 ne sont pas clivés après les résidus lysine K141 et K143. De plus, lors de l'analyse nous avons mesuré pour ces deux peptides, une masse additionnelle de 42,011 Da qui correspond à la masse d'un groupement acétyl, par rapport à la masse attendue (masse attendue pour 134-TAWVFDD~~K~~YK-143 : 1272,63 Da, masse mesurée : 1314,64 ; masse attendue pour 142-Y~~K~~RPGYGAYDAFK-154 : 1535,76 Da, masse mesurée : 1577,77). Cette masse supplémentaire étant située sur les résidus K141 et K143, nous pouvons en déduire que ces deux résidus sont acétylés (figure 68).



**Figure 68 : Spectre des peptides acétylés.**

(A) Le peptide 134-TAWVFDDKYK-143 présente une masse supplémentaire de 42,011 Da, l'analyse du spectre du peptide permet d'identifier une acétylation du résidu K141. (B) Le peptide 142-YKRPGYGAYDAFK-154 présente une masse supplémentaire de 42,011 Da, l'analyse du spectre du peptide permet d'identifier une acétylation du résidu K143.  $m/z$  = rapport masse/charge du peptide

Pour déterminer si l'acétylation de ces résidus est régulée par SIRT1, nous avons comparé la quantité de peptides acétylés détectés dans des immunoprécipitats d'eIF2 $\alpha$  réalisés à partir d'extraits de cellules H9c2 traitées ou non par l'EX527.



**Figure 69 :** L'acétylation des résidus K141 et K143 est régulée par SIRT1. L'inhibition de SIRT1 induit une augmentation de l'acétylation des résidus K141 et K143 d'eIF2 $\alpha$ . CTL: contrôle.

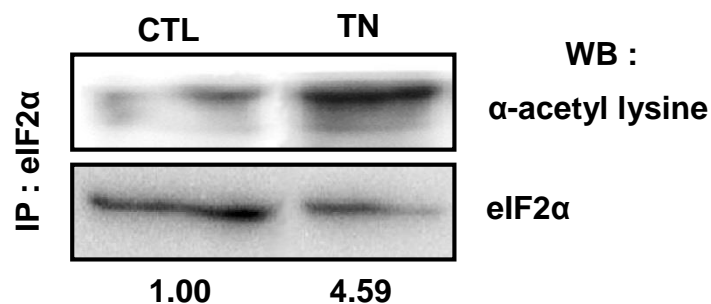
Nous retrouvons une acétylation des résidus K141 et K143 dans les deux conditions (figure 69). De manière intéressante l'inhibition de SIRT1 induit une augmentation importante de l'acétylation des deux résidus lysines détectés, ce qui indique que SIRT1 régule l'acétylation des résidus lysines K141 et K143. Pour savoir si l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  sur ces deux résidus pourrait être un processus conservé à travers les espèces, nous avons réalisé un alignement des séquences d'eIF2 $\alpha$  de l'homme, du rat, de la souris, du singe, du chien, de la vache, du poulet, du xénope et du poisson zèbre.

		141	143
		↓	↓
Rat	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Human	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Mouse	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Monkey	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Dog	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Cow	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Chicken	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LFQRTAWVFDD	KY	KRPGYGAY-150
Xenopus	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLDTYKDEQLDSL FQRTAWVFDE	KY	KKPGYGAY-150
Zebrafish	105-KFTKSKTVYSILRHVAEVLEYTKDEQLES LYQRTAWVFDE	KY	KRPGYGAY-150

**Figure 70 :** Les résidus K141 et K143 sont des résidus très conservés entre les différentes espèces. L'alignement de la séquence d'eIF2 $\alpha$  de différentes espèces (rat, homme, souris, singe, chien, vache, poulet, xénope, poisson zèbre) indique que ces résidus sont très conservés.

La séquence d'eIF2 $\alpha$  est dans l'ensemble très similaire dans toutes les espèces testées (figure 70). De plus, les deux résidus lysine K141 et K143 sont conservés dans ces différentes espèces. L'ensemble de ces résultats indiquent qu'eIF2 $\alpha$  est une protéine acétylée sur les deux résidus lysine très conservés K141 et K143 et que cette acétylation est régulée par SIRT1.

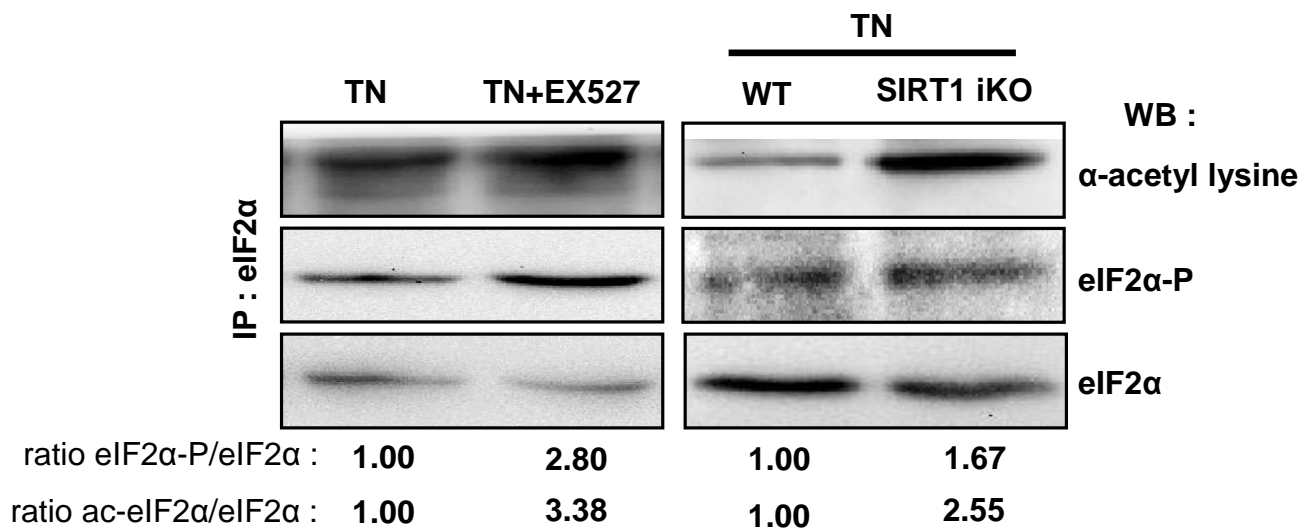
Nous nous sommes demandé si l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  était observée lors d'un stress RE. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse à un traitement par TN dans les cellules H9c2. Les résultats obtenus montrent que l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée en réponse au stress RE (figure 71).



**Figure 71 : L'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée en réponse au stress RE.**

*La TN induit une augmentation de l'acétylation d'eIF2 $\alpha$*

Afin de déterminer si SIRT1 module l'acétylation de cette protéine en réponse au stress RE, nous avons mesuré l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  après un traitement par TN, en présence ou en absence d'EX527 dans les cellules H9c2, mais également chez des souris sauvages ou SIRT1 iKO. Lorsque SIRT1 est inhibée ou invalidée, l'augmentation de l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse au stress RE est plus importante (figure 72, ratio ac-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ ). SIRT1 est donc impliquée dans la régulation de l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse au stress RE. Nous pouvons également remarquer que lorsque l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée, sa phosphorylation est également augmentée (figure 72 ratio eIF2 $\alpha$ -P/eIF2 $\alpha$ ). Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien entre le degré d'acétylation et le degré de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .



**Figure 72 :** En réponse au stress RE, l'acétylation d'eIF2α est plus importante lorsque *SIRT1* est inhibée ou invalidée. L'inhibition de *SIRT1* par l'EX527 (cellules H9c2) ou l'invalidation de *SIRT1* (souris iKO), induit l'augmentation de l'acétylation et de la phosphorylation en réponse au stress RE. eIF2α-P : phosphorylation d'eIF2α. Ac-eIF2α : acétylation d'eIF2α.

***Introduction***

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

***Annexes***





## **Chapitre I : Etude et caractérisation de la dysfonction cardiaque induite par le stress RE dans un modèle murin**

### **I. Contexte de l'étude**

En réponse à un stress cardiaque, le fonctionnement du cœur est modifié et un certain nombre de processus adaptatifs sont activés. Par exemple, une hypertrophie et une modulation du métabolisme énergétique surviennent afin de permettre le maintien d'un débit cardiaque suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. Certaines de ces adaptations, qui sont dans un premier temps nécessaires et positives pour le fonctionnement correct du cœur, finissent par favoriser le développement de la pathologie et de la dysfonction cardiaque (Burchfield, Xie et al. 2013). Ainsi, après un infarctus, l'hypertrophie qui permet de compenser la perte de tissu cardiaque et de maintenir un débit cardiaque suffisant, devient délétère lorsqu'elle est trop importante et participe à la transition d'un stade où les atteintes cardiaques sont compensées vers un stade où elles ne le sont plus et où la fonction cardiaque est altérée. La transition du stade compensé vers le stade décompensé est encore mal comprise. Une part importante des efforts fournis dans le domaine de la recherche cardiovasculaire est donc orientée vers la découverte de nouvelles voies de signalisations qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes régulant la transition d'adaptations bénéfiques vers des effets délétères, lors du développement des pathologies cardiaques.

Comme nous l'avons vu, le stress RE est impliqué dans la majorité des pathologies cardiaques (Minamino and Kitakaze 2010). De plus, la réponse au stress RE déclenche l'activation de la voie UPR qui est dans un premier temps adaptative, mais qui devient délétère lorsque le stress RE est sévère ou prolongé. De ce fait, le stress RE apparaît comme un processus pouvant être impliqué dans la transition du stade adaptatif vers le stade pathologique dans le cœur. L'intérêt pour le stress RE dans le domaine cardiovasculaire est très récent et peu de choses sont donc connues sur le rôle physiologique, les changements morphologiques et les modifications biochimiques associées au stress RE. L'objectif de notre étude était donc, dans un premier temps, de développer un modèle *in vivo* de stress RE, afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les effets du stress RE dans le cœur.

## II. Principaux résultats obtenus

Nous avons développé un modèle d'induction de stress RE in vivo par injection de tunicamycine qui nous a permis de démontrer que le stress RE induit :

1. des modifications importantes de l'architecture du cardiomyocyte avec une désorganisation spatiale des sarcomères, une augmentation de la quantité de RE et des sites de contacts RE/mitochondries ainsi qu'une perturbation de la structure mitochondriale.
2. des altérations importantes de la fonction énergétique mitochondriale
3. une accumulation de gouttelettes lipidiques corrélée à une inhibition de l'utilisation relative des acides gras et une augmentation de l'utilisation relative des substrats glycolytiques.
4. une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans le système de transferts énergétiques des créatines kinases.

## III. Discussion des résultats

### A. Dysfonction mitochondriale et stress RE

En réponse à un stress, le cœur doit être capable de produire une quantité importante d'ATP pour pouvoir maintenir un débit cardiaque suffisant pour répondre aux besoins de l'organisme, tout en déclenchant de nombreux processus cellulaires visant à rétablir l'homéostasie. Aujourd'hui, même s'il est clairement établi que la fonction mitochondriale est altérée chez l'insuffisant cardiaque (Neubauer 2007, Ventura-Clapier, Garnier et al. 2011), les mécanismes de cette altération ne sont pas entièrement élucidés. Nous montrons ici pour la première fois que le stress RE induit une dysfonction mitochondriale importante, ce qui suggère que le stress RE observé chez des patients atteints de pathologies cardiaques (Dally, Monceau et al. 2009) pourrait contribuer aux altérations de l'énergie mitochondriale.

Bien que notre étude démontre clairement une altération de la fonction mitochondriale en réponse au stress RE, elle ne permet pas de déterminer les mécanismes responsables de cette altération. Néanmoins, les photos obtenues par microscopie électronique suggèrent que

l'augmentation des interactions RE/mitochondries que nous avons observée en réponse au stress RE pourrait être à l'origine des altérations de la fonction mitochondriale. En effet, il a été montré dans différents types cellulaires qu'au cours d'un stress RE, le nombre de sites de contact RE/mitochondrie augmentent, favorisant les transferts calciques entre ces deux organites, la perméabilisation des membranes mitochondriales et le déclenchement de l'apoptose mitochondriale. (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008, Gallerne, Prola et al. 2013). Une seconde hypothèse est que l'altération de la fonction mitochondriale observée serait liée à une altération de la biogénèse mitochondriale. En effet, une diminution de la masse mitochondriale pourrait alors expliquer la diminution de la consommation d'oxygène dans les cardiomyocytes mesurée en réponse au stress RE. Pour tester cette hypothèse, nous mesurons actuellement l'expression de différents facteurs impliqués dans la biogénèse mitochondriale par RT-PCRq (PGC1- $\alpha$ , Tfam,...).

## **B. Le stress RE responsable de la modification de l'utilisation des substrats énergétiques ?**

Au cours du développement de la pathologie cardiaque, il est classiquement observé une transition d'une utilisation préférentielle de substrats énergétiques de type acide gras, vers une utilisation de substrats glycolytiques (Osorio, Stanley et al. 2002, Nascimben, Ingwall et al. 2004). De manière conceptuelle, cette transition peut paraître logique. En effet, le cœur en état de stress doit produire plus d'ATP pour pouvoir s'adapter, or les substrats glycolytiques sont métabolisés par des systèmes enzymatiques plus rapides que les systèmes métabolisant les acides gras. La production d'ATP à partir des substrats glycolytiques est donc plus rapide et également plus efficace puisque le rapport P/O (phosphate/oxygène) est plus élevé que pour d'autres types de substrats. Cette transition de l'utilisation des acides gras vers des substrats glycolytiques peut donc être considérée comme un marqueur permettant d'identifier une situation de stress cardiaque. Dans notre étude nous avons démontré que le stress RE induit une inhibition de l'utilisation relative des acides gras et une augmentation de l'utilisation relative des substrats glycolytiques. Le stress RE observé chez les patients atteints de pathologies cardiaques pourrait donc être en partie responsable de ce « shift métabolique ». Ce résultat est en adéquation avec différentes publications suggérant que le stress RE joue un rôle important dans la régulation du métabolisme. Par exemple, lors d'un stress RE, SREBP-1c qui stimule la synthèse d'acide gras (Joly-Amado, Denis et al. 2012), est activée et induit une accumulation de graisses dans le foie (Fang, Wan et al. 2013). D'autre part, l'injection

intrapéritonéale de TN chez la souris, induit un stress RE dans le foie qui est associé à une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides tels que PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$  (Rutkowski, Wu et al. 2008). Pour déterminer les mécanismes responsables des modifications du métabolisme des acides gras et des substrats glycolytiques induit dans les cardiomyocytes par un stress RE, nous proposons d'analyser la fonction des transporteurs mitochondriaux d'acides gras à longue chaîne CPT1 et CPT2. Nous mesurerons également l'activité enzymatique de l'HADHA, considérée comme l'enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation, ainsi que l'expression de facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du métabolisme des acides gras (tels que PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$ ). En ce qui concerne l'augmentation de l'utilisation des substrats de type glycolytiques, nous avons pour objectif de mesurer l'expression (i) des différents isoformes de la LDH, protéine jouant un rôle clé dans la glycolyse, (ii) de transporteurs du glucose tel que GLUT4, (iii) de différentes protéines impliquées dans l'utilisation du glucose telles que les pyruvates déshydrogénases kinases.

### C. Le stress RE perturbe le système transfert énergétique des créatines kinases

Les transferts énergétiques, systèmes permettant de coupler la production mitochondriale d'ATP et son utilisation par les ATPases cellulaires et qui jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des cardiomyocytes, sont altérés chez les patients atteints d'insuffisants cardiaques (De Sousa, Veksler et al. 1999). Ainsi, la concentration en phosphocréatine (PCr), un intermédiaire de la navette des créatines kinases, système de transfert énergétique majoritaire dans le cœur, est diminuée dans une situation pathologique. Cette concentration en PCr est considérée comme un indicateur du bon fonctionnement du cardiomyocyte et un paramètre prédictif de la mortalité dans les cardiomyopathies dilatées (Neubauer, Horn et al. 1997). Il a été montré que l'efficacité, l'organisation spatiale et l'expression des enzymes régulant cette navette sont modifiés, conduisant à un découplage entre la production et l'utilisation d'ATP, contribuant ainsi au manque d'énergie du cœur insuffisant (Neubauer New Engl J med). Notre étude démontre que le stress RE induit une altération de l'architecture cellulaire, une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans la navette des créatines kinases et une altération des systèmes de transferts énergétiques. Ces observations sont similaires à celles obtenues dans des modèles de perturbation de l'architecture des cardiomyocytes tels que l'insuffisance cardiaque (Joubert, Wilding et al.

2008), l'ischémie (Rauch, Schulze et al. 1994), le diabète (Savabi and Kirsch 1991) ou la cardiomyopathie dilatée (Wilding, Joubert et al. 2006, Diguet, Mallat et al. 2011). Il est donc possible que l'altération des transferts énergétiques en réponse au stress RE soit liée à la perturbation de l'architecture cellulaire.

Nous avons observé qu'en réponse au stress RE, le  $K_m$  pour l'ADP sans créatine n'est pas modifié, mais qu'en présence de créatine il est augmenté, révélant une altération de la navette des créatines kinases. Pour calculer le  $K_m$  pour l'ADP sur fibres perméabilisées, nous avons utilisé un protocole consistant en l'ajout de deux concentrations différentes d'ADP (100  $\mu$ M, puis 2mM) entrecoupé par un ajout de créatine. Cette approche présente l'avantage de permettre de mesurer à partir d'un seul protocole, pour les mêmes fibres dans la même cuve, différents paramètres de la fonction mitochondriale et de pouvoir estimer un  $K_m$  pour l'ADP avec et sans créatine. Nous pouvons donc recueillir un nombre important d'informations avec peu de matériel, ce qui est particulièrement utile lorsque l'on travaille sur des cœurs de souris. Toutefois, les  $K_m$  ainsi calculés sont des estimations et bien que ces mesures soient cohérentes, leur confirmation par un protocole classique de mesure du  $K_m$  consistant en plusieurs ajouts successifs d'ADP en présence ou non de créatine doit être envisagée. D'autre part, nous sommes actuellement en train de quantifier les différents isoformes des créatines kinases, ce qui nous permettra de mieux comprendre les raisons de l'altération de cette navette.

## **IV. Limites de l'étude et perspectives**

L'injection intrapéritonéale de TN pour induire un stress RE dans le cœur est un modèle qui comme tout modèle a ses limites. Notamment, une telle injection provoque une libération de TN dans tout l'organisme entraînant un stress RE de manière non-ciblée dans différents organes. Les données anatomiques que nous avons recueillies montrent ainsi qu'en plus du cœur, le foie est également atteint. L'injection intrapéritonéale de TN est d'ailleurs un modèle utilisé pour étudier le rôle du stress RE dans les pathologies hépatiques (Yamamoto, Takahara et al. 2010, Lee, Zheng et al. 2012). Il est important de rappeler que même si l'induction de stress RE par la TN n'est pas un modèle de pathologie cardiaque, il permet d'étudier spécifiquement le rôle physiopathologique du stress RE dans le cœur, en s'affranchissant des effets pléiotropes liés au développement de pathologies cardiaques. En collaboration avec Marta Novotova (Institute of molecular physiology and genetics, Bratislava, Slovak Republic), nous avons débuté une étude comparative des effets du stress RE induit dans les

cardiomyocytes par TN, par le diabète et par un traitement à l'isoprénaline. Ce travail devrait nous permettre de mieux appréhender le rôle du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques.

Néanmoins, le développement de modèles d'induction de stress RE uniquement dans le cœur doit être envisagé. Actuellement, plusieurs modèles de souris transgéniques invalidées de manière générale pour un gène impliqué dans la maturation des protéines dans le RE ont été développés et sont connus pour être associés au déclenchement d'un stress RE. Ainsi, la délétion de la chaperonne calréticuline ou du récepteur KDEL (impliqué dans le flux rétrograde des protéines de l'appareil de Golgi vers le RE) induit un stress RE important, qui conduit à la mort au stade embryonnaire lors de l'extinction de calréticuline (Mesaeli, Nakamura et al. 1999) ou 14 semaines après la naissance lors de l'extinction du récepteur KDEL (Hamada, Suzuki et al. 2004). Dans ces deux modèles, la délétion de ces protéines induit des problèmes développementaux qui prouvent que ces protéines jouent un rôle important, mais qui limitent l'intérêt de ces modèles pour l'étude du stress RE. Il existe également un modèle de souris permettant l'invalidation spécifique de la chaperonne GRP78 dans les cellules souches hématopoïétiques (Wey, Luo et al. 2012). Nous pourrions ainsi envisager de croiser les souris GRP78 LoxP avec des souris exprimant une Cre recombinase couplée au promoteur  $\alpha$ -MHC afin de rendre la délétion de GRP78 cardio-spécifique. Cependant il a récemment été démontré qu'il existerait une isoforme cytosolique de GRP78, issu d'un épissage alternatif (Ni, Zhou et al. 2009). La délétion de GRP78 pourrait donc avoir des effets cytosoliques indésirables indépendamment de sa fonction de chaperonne du RE. Une autre stratégie consisterait à générer des souris permettant l'invalidation inductible et cardio-spécifique de l'enzyme impliquée dans la N-glycosylation des protéines, la GlcNAc phosphotransférase. Cette protéine est la cible de TN qui inhibe son activité enzymatique (Heifetz, Keenan et al. 1979). Ce modèle permettrait donc d'induire un stress RE à l'âge adulte, spécifiquement dans le cœur. De plus, la génération de souris homozygotes ou hétérozygotes permettrait de disposer de modèles de stress RE modéré ou plus sévère, permettant de mieux comprendre le rôle du stress RE adaptatif ou délétère dans la fonction cardiaque et le développement de la pathologie.

## **Chapitre II : étude du rôle de SIRT1 dans la réponse au stress RE des cardiomyocytes**

### **I. Contexte de l'étude**

L'objectif actuel des recherches sur le stress RE dans le domaine cardiovasculaire a pour but non pas d'inhiber ce stress mais plutôt de le moduler de manière à conserver les réponses bénéfiques adaptatives et à limiter le déclenchement de l'apoptose délétère. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que SIRT1, déacétylase connue pour être activée en réponse à de nombreux stress cardiaques et pour jouer un rôle cardioprotecteur, serait activée par un stress RE et permettrait de limiter le déclenchement de l'apoptose.

Au commencement de ma thèse, un certain nombre d'indices nous ont permis d'émettre cette hypothèse :

- Tout d'abord, SIRT1 est une protéine activée en réponse à de nombreux stress, dont beaucoup peuvent conduire à un stress RE tels que la restriction calorique, le stress oxydant ou encore l'hypoxie.
- D'autre part, un lien entre le stress RE et le Resveratrol, considéré comme un activateur de SIRT1 avait été établi (Park, Woo et al. 2007, Yoon, Kwon et al. 2011). Bien que cette molécule ne soit pas un activateur direct et spécifique de SIRT1 mais plutôt une molécule aux effets pléiotropes, on peut penser qu'une partie des effets induits par le Resveratrol sur le stress RE serait liée à SIRT1.
- Il avait également été montré que le MiR 199a-5p, connu pour inhiber l'expression de SIRT1, inhibe également l'expression de la chaperonne GRP78, membre clé de la réponse UPR (Rane, He et al. 2009, Su, Chang et al. 2013). De plus, l'expression des MiR 199a-5p et Mir34a (régulant lui aussi l'expression de SIRT1) est diminuée lors d'un stress RE (Duan, Wang et al. 2012, Upton, Wang et al. 2012).
- D'autres auteurs avaient mis en évidence que l'inhibition de CK2 (Casein Kinase 2), connue pour phosphoryler et ainsi activer SIRT1 (Kang, Jung et al. 2009), induit un stress RE aboutissant à l'apoptose (Hessenauer, Schneider et al. 2011).

Nous avons donc développé différentes approches et différents modèles nous permettant d'étudier le rôle de SIRT1 dans la réponse au stress RE des cardiomyocytes.



## II. Principaux résultats obtenus

Nos travaux sont les premiers à démontrer que SIRT1 joue un rôle cardioprotecteur dans la réponse au stress RE et ont permis d'identifier une nouvelle cible de SIRT1 permettant la régulation de la voie UPR. Par des approches *in vitro* et *in vivo* nous avons mis en évidence dans les cellules cardiaques que :

1. l'expression et l'activité de SIRT1 sont augmentées en réponse au stress RE délétère
2. l'inhibition pharmacologique, l'extinction ou l'invalidation de SIRT1 augmente l'apoptose des cardiomyocytes
3. l'activation de SIRT1 par le STAC3 protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par le stress RE
4. SIRT1 régule spécifiquement l'activation de la branche PERK de la voie UPR en réponse au stress RE
5. eIF2 $\alpha$  est une cible de SIRT1 dans la branche PERK et l'acétylation des résidus lysine K141 et K143 est régulée par cette déacétylase

## III. Discussion des résultats et perspectives

### A. Régulation de l'expression et de l'activité de SIRT1 en réponse au stress RE

Il a été démontré que l'expression de SIRT1 est augmentée dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le chien et chez le hamster (Alcendor, Kirshenbaum et al. 2004, Tanno, Kuno et al. 2010), mais les mécanismes régulant cette expression de SIRT1 n'ont pas été décrits. Dans notre étude, nous avons montré que l'expression de SIRT1 est augmentée en réponse au stress RE dans les cellules cardiaques. Puisque le stress RE est associé au développement de la plupart des pathologies cardiaques, il pourrait être responsable de l'augmentation de l'expression de SIRT1 dans le cœur au cours de l'insuffisance cardiaque. Dans une autre étude, il a été mis en évidence qu'ATF4, facteur de transcription activé au cours du stress RE, régule l'expression de SIRT1 (Zhu, Xia et al. 2012). D'autre part, les Micro ARN MiRs 199 et 34a, tous deux connus pour diminuer la traduction de l'ARNm de SIRT1, ont une expression diminuée lors d'un stress RE (Rane, He et al. 2009, Duan, Wang et al. 2012, Upton, Wang et al. 2012). Dans le cœur, l'expression de SIRT1 pourrait donc être augmentée

par ATF4 ou par la diminution des MiR 199 et 34a en réponse au stress RE. Nous pourrions donc envisager la quantification de ces deux MiR en réponse au stress RE dans nos modèles d'étude.

En ce qui concerne l'activité de SIRT1, il est connu qu'une augmentation de la disponibilité en  $\text{NAD}^+$ , le cofacteur de SIRT1, induit une augmentation importante de l'activité déacétylase de cette protéine. Il apparaît donc intéressant de quantifier le  $\text{NAD}^+$  en réponse au stress RE, afin de déterminer si l'activation de cette sirtuine est liée à l'augmentation de son cofacteur. D'autre part, il a été démontré que JNK ou CK2 peuvent phosphoryler SIRT1, stimulant ainsi son activité déacétylase (Kang, Jung et al. 2009, Nasrin, Kaushik et al. 2009). Puisque ces kinases sont activées en réponse au stress RE (Urano, Wang et al. 2000, Ampofo, Sokolowsky et al. 2013) elles pourraient être responsables de l'activation de SIRT1 observée dans notre modèle. D'autres kinases, capables d'activer SIRT1 par phosphorylation, pourraient également être impliquées telles que CAMKII (Wen, Chen et al. 2013), DYRK1A et DYRK3 (Guo, Williams et al. 2010), CDK5 (Bai, Liang et al. 2012) ou encore PKA (Gerhart-Hines, Dominy et al. 2011). Afin de déterminer l'implication de ces kinases dans l'activation de SIRT1 en réponse au stress RE dans les cellules cardiaques, nous mesurerons l'acétylation des cibles de SIRT1 (p53 et histone 1) et l'apoptose en réponse à TG et TN, en présence ou en absence d'inhibiteurs de ces différentes kinases. Si l'une de ces kinases est responsable de l'activation de SIRT1 en réponse au stress RE, l'inhibiteur correspondant devrait bloquer la déacétylation des cibles de SIRT1 et augmenter l'apoptose. Ce travail, concernant l'activation de SIRT1 par le  $\text{NAD}^+$  ou par les différentes kinases, fait actuellement l'objet d'un stage de master 2.

## B. Rôle cardioprotecteur de SIRT1 dans l'apoptose induite par le stress RE

Différentes études ont démontré un rôle protecteur de SIRT1 en réponse à de multiples stress. Par exemple, SIRT1 protège de la mort cellulaire induite par l'ischémie reperfusion (Hsu, Zhai et al. 2010), un stress oxydant (Alcendor, Gao et al. 2007, Vinciguerra, Santini et al. 2012), ou des molécules chimiothérapeutiques telles que la doxorubicine ou le cisplatine (Zhu, Xia et al. 2012). Dans notre étude, nous avons démontré un rôle cardioprotecteur de SIRT1 dans l'apoptose induite par un stress RE. Un nombre important de nos résultats ont été obtenus en utilisant l'inhibiteur pharmacologique de SIRT1 EX527. Toute utilisation de molécules pharmacologiques soulève la question de la spécificité d'action de cet inhibiteur.

Parmi les nombreux inhibiteurs de SIRT1 disponibles (Sirtinol, Salermide, Nicotinamide...), l'EX527 est le plus spécifique et est décrit comme le seul à avoir une affinité beaucoup plus importante pour SIRT1 que pour les autres sirtuines (Peck, Chen et al. 2010). En effet, l'IC<sub>50</sub> de l'EX527 pour SIRT1 est de 38nM, contre 19,6μM pour SIRT2, 48,7μM pour SIRT3. De plus, aucun effet inhibiteur des sirtuines 4 à 7 n'a été observé jusqu'à 100μM. Cet inhibiteur, qui a été découvert suite à un screening de 300 000 molécules par la société Elixir, est un mélange racémique d'EX523 et d'EX524, l'EX524 étant la molécule inhibitrice de SIRT1. Son mécanisme d'action n'a été découvert que récemment grâce à une étude par cristallographie qui a permis de révéler que l'EX527 perturbe la fixation du NAD<sup>+</sup>, cofacteur de SIRT1, ce qui limite le recrutement des substrats de cette sirtuine et bloque leur déacétylation (Zhao, Allison et al. 2013). En ce qui concerne la plupart des autres inhibiteurs de SIRT1, il a été démontré qu'ils inhibent également d'autres sirtuines (notamment SIRT2 en ce qui concerne le Sirtinol et le Salermide). La modulation de la mort cellulaire induite par les inhibiteurs autre qu'EX527 est donc supposée associée à l'inhibition non spécifique d'autres sirtuines (Peck, Chen et al. 2010). Les résultats que nous avons obtenus avec l'EX527 sont cohérents avec ceux obtenus par extinction de SIRT1 par siRNA *in cellulo* ou dans notre modèle de souris invalidées pour SIRT1. Dans chacun de ces cas, la perte de l'activité de SIRT1 augmente l'apoptose induite par le stress RE. Il apparaît donc que l'EX527 a une bonne spécificité d'action dans nos conditions expérimentales. Il est intéressant de noter qu'aucun effet délétère n'a été observé lors d'un essai clinique de phase I en utilisant l'EX527 et qu'un essai clinique de phase II teste actuellement le potentiel effet protecteur de l'inhibition de SIRT1 par l'EX527 dans un contexte de maladie d'Huntington.

Nous avons mis en évidence *in vivo* que l'altération du fonctionnement du cœur induite par le stress RE est associée à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes, suggérant que cette mort participe à l'établissement de la dysfonction cardiaque. Néanmoins, il est probable que d'autres modifications telles que la perturbation du métabolisme énergétique, que nous avons décrit dans la première partie des résultats, contribuent également à l'atteinte cardiaque induite lors d'un stress RE. Quoi qu'il en soit, en accord avec nos observations, différents auteurs ont montré que l'apoptose déclenchée en réponse au stress RE pourrait participer au développement de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, la cardiomyopathie auto-immune, la cardiomyopathie induite par des drogues anti-cancéreuses... (Okada, Minamino et al. 2004, Mao, Fukuoka et al. 2007, Force and Kerkela 2008). L'apoptose est connue pour être très délétère dans le cœur et même à faible taux, cette apoptose peut induire une altération importante la fonction cardiaque. En effet, une étude a

montré que chez des souris exprimant une forme active cardiospécifique de la caspase 8, la faible augmentation d'apoptose induite dans les cardiomyocytes (25 cellules en apoptose pour  $10^5$  cellules contre 7 cellules en apoptose pour  $10^5$  cellules chez une souris sauvage), suffit à altérer la fonction cardiaque en seulement 9 semaines (Wencker, Chandra et al. 2003). Il paraît donc raisonnable de penser que le taux d'apoptose élevé que nous avons observé, dans notre modèle en réponse au stress RE contribue de manière conséquente aux altérations de la fonction cardiaque.

STAC3 est une molécule activatrice de SIRT1 appartenant à la 3<sup>ème</sup> génération des molécules développées par la société Sirtris. L'action directe de cette molécule sur SIRT1 a été démontrée *in vitro*, mais peu de données sont rapportées *in cellulo* (Hubbard, Gomes et al. 2013). De par sa découverte récente, le STAC3 n'avait encore jamais été testé dans un contexte d'étude de la mort cellulaire. Toutefois, les générations précédentes d'activateur de SIRT1 telles que le SRT1720 (Fan, Yang et al. 2013, Gueguen, Palmier et al. 2014) ou le resveratrol (Lin, Chen et al. 2014) avaient déjà été associés à une diminution de la mort cellulaire en réponse à différents types de stress dans différents modèles. Nos résultats démontrent que l'activation de SIRT1 par STAC3 inhibe complètement la mort cellulaire des cardiomyocytes induite par le stress RE. Les stratégies consistant à activer SIRT1 semblent donc très prometteuses et même si de nombreux tests et validations sont encore nécessaires, le développement de molécules activatrices de SIRT1 pourrait permettre d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des cardiopathies, mais aussi plus généralement pour d'autres pathologies associées au stress RE (diabète, maladies neurodégénératives...).

### C. SIRT1 régule l'activation de la branche PERK en réponse au stress RE dans les cardiomyocytes

Une des découvertes importantes de notre étude est l'augmentation de l'activation de la branche PERK en réponse au stress RE lorsque SIRT1 est inhibée. Nous avons en effet observé que l'inhibiteur (*in vitro*) et l'invalidation (*in vivo*) de SIRT1 augmentent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'expression d'ATF4, GADD34 et CHOP induits par le stress RE. Une étude sur des cellules Hela, publiée en 2012, suggère également un lien entre SIRT1 et la branche PERK (Ghosh, Reizis et al. 2011). Dans ce travail les auteurs montrent par IP que SIRT1 interagit avec eIF2 $\alpha$ , GADD34 et Crep. GADD34 et Crep sont impliquées dans une boucle de rétro contrôle négatif, permettant la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  afin de favoriser le

retour à l'homéostasie cellulaire. De manière similaire aux résultats que nous avons obtenus, Ghosh et al. démontrent que l'inhibition de SIRT1 induit une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse au stress RE. Néanmoins, alors que dans les cardiomyocytes nous avons observé une augmentation de l'expression de CHOP et de GADD34 lorsque SIRT1 est inhibée, ces auteurs rapportent au contraire une diminution de leur expression. Sachant que CHOP et GADD34 ne sont exprimés que lorsqu'eIF2 $\alpha$  est phosphorylée, il paraît cohérent que l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  soit associée à l'augmentation de l'expression de ces protéines. De plus, bien qu'ils démontrent une interaction entre SIRT1 et eIF2 $\alpha$ , Crep et GADD34, ces auteurs ne détectent pas d'acétylation de ces protéines. Enfin, l'expression d'une forme mutée de SIRT1, dépourvue d'activité de déacétylase, ou d'une forme mutée d'eIF2 $\alpha$  non phosphorylable, ne modifie pas les interactions entre SIRT1 et eIF2 $\alpha$ . Ghosh et al. proposent alors que l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  observée lorsque SIRT1 est inhibée soit due à une diminution de la déphosphorylation médiée par Crep et GADD34. Nos résultats suggèrent un mécanisme différent dans les cardiomyocytes. En effet, d'une part, nous avons identifié deux résidus lysine d'eIF2 $\alpha$  dont l'acétylation est régulée par SIRT1 en réponse au stress RE et d'autre part, nous avons montré que cette acétylation augmente de manière parallèle avec la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , suggérant ainsi un lien direct entre le degré d'acétylation et le degré de phosphorylation de cette protéine. De plus, nous avons confirmé les résultats que nous avons obtenus sur la lignée cellulaire H9c2 dans notre modèle *in vivo*, indiquant l'existence de ces mécanismes dans un contexte plus physiologique.

#### D. eIF2 $\alpha$ , une protéine clé de la réponse au stress RE dans les cardiomyocytes ?

Dans notre étude, nous avons démontré que l'inhibition de SIRT1 entraîne une hyperphosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , augmentant ainsi l'expression de CHOP et l'activation de l'apoptose en réponse au stress RE. Ces résultats suggèrent qu'eIF2 $\alpha$  et sa phosphorylation joueraient un rôle clé dans régulation du devenir des cardiomyocytes en réponse au stress RE. eIF2 $\alpha$  est connu pour jouer un rôle aussi bien dans les mécanismes adaptatifs de la réponse au stress RE en inhibant la synthèse générale des protéines, que dans les effets délétères en activant l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP via ATF4. La transition des réponses adaptatives vers les réponses délétères régulées par eIF2 $\alpha$  n'est cependant pas complètement élucidée. Ainsi, il a été montré que le salubrinal, qui induit une hyperphosphorylation

d'eIF2 $\alpha$ , protège le cœur de l'infarctus ou d'une hyper stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Dalal, Foster et al. 2012, Liu, Wang et al. 2014). Par ailleurs, l'inhibition de PERK qui se traduit par une diminution de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , protège de l'apoptose induite par un stress RE (Kim, Raphael et al. 2014). Certains auteurs proposent que la phosphorylation modérée d'eIF2 $\alpha$  jouerait un rôle protecteur, alors que son hyperphosphorylation serait délétère (Donnelly, Gorman et al. 2013).

Afin de mieux comprendre le rôle de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les cardiomyocytes, nous avons pour projet de moduler cette phosphorylation par des approches pharmacologiques et génétiques et de mesurer les répercussions sur la mort cellulaire induite par le stress RE. En réponse à TG et TN, l'hyperphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sera induite par le salubrinal, l'inhibition de cette phosphorylation par un inhibiteur de PERK (GSK2606414) ou par transfection d'un vecteur codant une forme mutée non phosphorylable d'eIF2 $\alpha$ . L'apoptose sera mesurée par cytométrie en flux.

## E. SIRT1 régule l'acétylation d'eIF2 $\alpha$ en réponse au stress RE

En utilisant des approches d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse, nous avons déterminé qu'en réponse au stress RE, eIF2 $\alpha$  est acétylée sur les résidus lysines K141 et K143 et que cette acétylation est régulée par SIRT1. De plus, nous avons observé que l'augmentation de l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  induite par l'inhibition de SIRT1 est associée à une augmentation de sa phosphorylation lors d'un stress RE, suggérant que ces modifications post-traductionnelles pourraient se réguler mutuellement. Des analyses par cristallographie ont permis de démontrer que le site de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51 n'est pas accessible à une kinase dans un état basal, permettant aux auteurs de suggérer que la conformation d'eIF2 $\alpha$  joue un rôle clé dans la régulation de sa phosphorylation (Dey, Velyvis et al. 2011). D'autre part, il a été proposé qu'une régulation post-traductionnelle encore inconnue d'eIF2 $\alpha$  pourrait modifier sa conformation afin de permettre sa phosphorylation (Donnelly, Gorman et al. 2013). Suite à nos résultats, il est raisonnable de penser qu'une acetyl-transférase serait activée en réponse au stress RE et acétylerait eIF2 $\alpha$  favorisant ainsi sa phosphorylation. Dans ce contexte, SIRT1 permettrait un rétrocontrôle négatif en déacétylant eIF2 $\alpha$  afin de limiter sa phosphorylation et ainsi diminuer l'activation de la branche PERK de la voie UPR. Nous avons généré des vecteurs codant une forme mutante d'eIF2 $\alpha$ , dont les résidus K141 et K143 ont été remplacés par des résidus arginine. Si notre hypothèse est correcte, la protéine produite ne devrait pas être acétylable, ce qui devrait affecter sa

phosphorylation par PERK et par conséquent l'apoptose induite par le stress RE délétère. En ce qui concerne l'acétyl-transférase impliquée dans l'acétylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse au stress RE, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps le rôle de GCN5 présente dans le cytoplasme comme eIF2 $\alpha$  et impliquée dans l'acétylation de protéines régulées par SIRT1 telle que PGC-1 $\alpha$  (Yang and Seto 2008).

En conclusion l'ensemble de nos travaux a permis de démontrer le rôle cardioprotecteur de SIRT1 dans la réponse au stress RE et d'identifier la voie de signalisation et la cible régulée par cette déacétylase. L'activation de SIRT1 apparait donc comme une stratégie thérapeutique envisageable pour le traitement des pathologies cardiaques associées au stress RE.



***Introduction***

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

***Annexes***



Abdelmohsen, K., R. Pullmann, Jr., A. Lal, H. H. Kim, S. Galban, X. Yang, J. D. Blethrow, M. Walker, J. Shubert, D. A. Gillespie, H. Furneaux and M. Gorospe (2007). "Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression." Mol Cell **25**(4): 543-557.

Acs, Z., Z. Bori, M. Takeda, P. Osvath, I. Berkes, A. W. Taylor, H. Yang and Z. Radak (2014). "High altitude exposure alters gene expression levels of DNA repair enzymes, and modulates fatty acid metabolism by SIRT4 induction in human skeletal muscle." Respir Physiol Neurobiol **196**: 33-37.

Ahn, J., H. Lee, C. H. Jung, T. I. Jeon and T. Y. Ha (2013). "MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade." EMBO Mol Med **5**(10): 1602-1612.

Akimoto, T., S. C. Pohnert, P. Li, M. Zhang, C. Gumbs, P. B. Rosenberg, R. S. Williams and Z. Yan (2005). "Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway." J Biol Chem **280**(20): 19587-19593.

Alcendor, R. R., S. Gao, P. Zhai, D. Zablocki, E. Holle, X. Yu, B. Tian, T. Wagner, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2007). "Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart." Circ Res **100**(10): 1512-1521.

Alcendor, R. R., L. A. Kirshenbaum, S. Imai, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2004). "Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes." Circ Res **95**(10): 971-980.

Alcolea, S., M. Theveniau-Ruissy, T. Jarry-Guichard, I. Marics, E. Tzouanacou, J. P. Chauvin, J. P. Briand, A. F. Moorman, W. H. Lamers and D. B. Gros (1999). "Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development." Circ Res **84**(12): 1365-1379.

Ampofo, E., T. Sokolowsky, C. Gotz and M. Montenarh (2013). "Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 439-451.

Anderson, R. M., K. J. Bitterman, J. G. Wood, O. Medvedik and D. A. Sinclair (2003). "Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **423**(6936): 181-185.

Antoniali, G., L. Lirussi, C. D'Ambrosio, F. Dal Piaz, C. Vascotto, E. Casarano, D. Marasco, A. Scaloni, F. Fogolari and G. Tell (2014). "SIRT1 gene expression upon genotoxic damage is regulated by APE1 through nCaRE-promoter elements." Mol Biol Cell **25**(4): 532-547.

Antonsson, B. (2004). "Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways." Mol Cell Biochem **256-257**(1-2): 141-155.

Aquilano, K., P. Vigilanza, S. Baldelli, B. Pagliei, G. Rotilio and M. R. Ciriolo (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis." J Biol Chem **285**(28): 21590-21599.

Argaud, L., O. Gateau-Roesch, D. Muntean, L. Chalabreysse, J. Loufouat, D. Robert and M. Ovize (2005). "Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol **38**(2): 367-374.

Argaud, L., J. Loufouat, O. Gateau-Roesch, L. Gomez, D. Robert and M. Ovize (2008). "Persistent inhibition of mitochondrial permeability transition by preconditioning during the first hours of reperfusion." Shock **30**(5): 552-556.

Arnold, J. M., J. G. Howlett, P. Dorian, A. Ducharme, N. Giannetti, H. Haddad, G. A. Heckman, A. Ignaszewski, D. Isaac, P. Jong, P. Liu, E. Mann, R. S. McKelvie, G. W. Moe, J. D. Parker, A. M. Svendsen, R. T. Tsuyuki, K. O'Halloran, H. J. Ross, V. Rao, E. J. Sequeira and M. White (2007). "Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference recommendations on heart failure update 2007: Prevention, management during intercurrent illness or acute decompensation, and use of biomarkers." Can J Cardiol **23**(1): 21-45.

Ayala, P., J. Montenegro, R. Vivar, A. Letelier, P. A. Urroz, M. Copaja, D. Pivet, C. Humeres, R. Troncoso, J. M. Vicencio, S. Lavandero and G. Diaz-Araya (2012). "Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol." Exp Mol Pathol **92**(1): 97-104.

Back, J. H., H. R. Rezvani, Y. Zhu, V. Guyonnet-Duperat, M. Athar, D. Ratner and A. L. Kim (2011). "Cancer cell survival following DNA damage-mediated premature senescence is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent Inhibition of sirtuin 1." J Biol Chem **286**(21): 19100-19108.

Back, S. H., D. Scheuner, J. Han, B. Song, M. Ribick, J. Wang, R. D. Gildersleeve, S. Pennathur and R. J. Kaufman (2009). "Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells." Cell Metab **10**(1): 13-26.

Bae, H. J., J. H. Noh, J. K. Kim, J. W. Eun, K. H. Jung, M. G. Kim, Y. G. Chang, Q. Shen, S. J. Kim, W. S. Park, J. Y. Lee and S. W. Nam (2013). "MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma." Oncogene.

Bai, B., Y. Liang, C. Xu, M. Y. Lee, A. Xu, D. Wu, P. M. Vanhoutte and Y. Wang (2012). "Cyclin-dependent kinase 5-mediated hyperphosphorylation of sirtuin-1 contributes to the development of endothelial senescence and atherosclerosis." Circulation **126**(6): 729-740.

Bai, P., C. Canto, H. Oudart, A. Brunyanszki, Y. Cen, C. Thomas, H. Yamamoto, A. Huber, B. Kiss, R. H. Houtkooper, K. Schoonjans, V. Schreiber, A. A. Sauve, J. Menissier-de Murcia and J. Auwerx (2011). "PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation." Cell Metab **13**(4): 461-468.

Baines, C. P., R. A. Kaiser, N. H. Purcell, N. S. Blair, H. Osinska, M. A. Hambleton, E. W. Brunskill, M. R. Sayen, R. A. Gottlieb, G. W. Dorn, J. Robbins and J. D. Molkentin (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." Nature **434**(7033): 658-662.

- Baksi, A., O. Kraydashenko, A. Zalevkaya, R. Stets, P. Elliott, J. Haddad, E. Hoffmann, G. P. Vlasuk and E. W. Jacobson (2014). "A Phase II, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Multi-Dose Study of SRT2104, a SIRT1 Activator, in Subjects With Type 2 Diabetes." Br J Clin Pharmacol.
- Bao, Q. and Y. Shi (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death Differ **14**(1): 56-65.
- Bause, A. S., M. S. Matsui and M. C. Haigis (2013). "The protein deacetylase SIRT3 prevents oxidative stress-induced keratinocyte differentiation." J Biol Chem **288**(51): 36484-36491.
- Beauharnois, J. M., B. E. Bolivar and J. T. Welch (2013). "Sirtuin 6: a review of biological effects and potential therapeutic properties." Mol Biosyst **9**(7): 1789-1806.
- Belaidi, E., J. Decorps, L. Augeul, A. Durand and M. Ovize (2013). "Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition." Basic Res Cardiol **108**(4): 363.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge and J. Frisen (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." Science **324**(5923): 98-102.
- Bernales, S., K. L. McDonald and P. Walter (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." PLoS Biol **4**(12): e423.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
- Bersell, K., S. Arab, B. Haring and B. Kuhn (2009). "Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury." Cell **138**(2): 257-270.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.
- Bessman, S. P. and A. Fonyo (1966). "The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration." Biochem Biophys Res Commun **22**(5): 597-602.
- Bieganowski, P. and C. Brenner (2004). "Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD<sup>+</sup> in fungi and humans." Cell **117**(4): 495-502.
- Blondel, B. A., A.; Martin-Latil, S.; Mousson, L.; Pelletier, I.; Couderc, T.; Colbère-Garapin, F. (2006). "Poliovirus et apoptose." Virologie **10**(number 1): 7-20.
- Boily, G., X. H. He, B. Pearce, K. Jardine and M. W. McBurney (2009). "SirT1-null mice develop tumors at normal rates but are poorly protected by resveratrol." Oncogene **28**(32): 2882-2893.

Boily, G., E. L. Seifert, L. Bevilacqua, X. H. He, G. Sabourin, C. Estey, C. Moffat, S. Crawford, S. Saliba, K. Jardine, J. Xuan, M. Evans, M. E. Harper and M. W. McBurney (2008). "SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice." PLoS One **3**(3): e1759.

Bonnefont, J. P., F. Djouadi, C. Prip-Buus, S. Gobin, A. Munnich and J. Bastin (2004). "Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects." Mol Aspects Med **25**(5-6): 495-520.

Borner, C. (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Mol Immunol **39**(11): 615-647.

Bratton, S. B. and G. S. Salvesen (2010). "Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome." J Cell Sci **123**(Pt 19): 3209-3214.

Braunwald, E. (1971). "Structure and function of the normal myocardium." Br Heart J **33**: Suppl:3-8.

Bravo, R., J. M. Vicencio, V. Parra, R. Troncoso, J. P. Munoz, M. Bui, C. Quiroga, A. E. Rodriguez, H. E. Verdejo, J. Ferreira, M. Iglewski, M. Chiong, T. Simmen, A. Zorzano, J. A. Hill, B. A. Rothmel, G. Szabadkai and S. Lavandro (2011). "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress." J Cell Sci **124**(Pt 13): 2143-2152.

Brenner, C. and S. Grimm (2006). "The permeability transition pore complex in cancer cell death." Oncogene **25**(34): 4744-4756.

Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science **303**(5666): 2011-2015.

Buler, M., S. M. Aatsinki, V. Izzi, J. Uusimaa and J. Hakkola (2014). "SIRT5 is under the control of PGC-1alpha and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism." FASEB J.

Burchfield, J. S., M. Xie and J. A. Hill (2013). "Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2." Circulation **128**(4): 388-400.

Burda, P., C. A. Jakob, J. Beinhauer, J. H. Hegemann and M. Aebi (1999). "Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases." Glycobiology **9**(6): 617-625.

Caffin, F., A. Prola, J. Piquereau, M. Novotova, D. J. David, A. Garnier, D. Fortin, M. V. Alavi, V. Veksler, R. Ventura-Clapier and F. Joubert (2013). "Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice." J Physiol **591**(Pt 23): 6017-6037.

Cai, L. (2008). "Alcoholic cardiomyopathy: acetaldehyde, insulin insensitization and ER stress." J Mol Cell Cardiol **44**(6): 979-982.

Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark and D. Ron (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**(6867): 92-96.

Calvo, S. E. and V. K. Mootha (2010). "The mitochondrial proteome and human disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **11**: 25-44.

Canto, C., R. H. Houtkooper, E. Pirinen, D. Y. Youn, M. H. Oosterveer, Y. Cen, P. J. Fernandez-Marcos, H. Yamamoto, P. A. Andreux, P. Cettour-Rose, K. Gademann, C. Rinsch, K. Schoonjans, A. A. Sauve and J. Auwerx (2012). "The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity." Cell Metab **15**(6): 838-847.

Cazeau, S., P. Ritter, A. Lazarus, D. Gras, H. Backdach, O. Mundler and J. Mugica (1996). "Multisite pacing for end-stage heart failure: early experience." Pacing Clin Electrophysiol **19**(11 Pt 2): 1748-1757.

Ceylan-Isik, A. F., M. R. Kandadi, X. Xu, Y. Hua, A. J. Chicco, J. Ren and S. Nair (2013). "Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction." J Mol Cell Cardiol **63**: 4-13.

Ceylan-Isik, A. F., N. Sreejayan and J. Ren (2011). "Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction." J Mol Cell Cardiol **50**(1): 107-116.

Chan, D. C. (2006). "Mitochondrial fusion and fission in mammals." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 79-99.

Chaudhuri, A. D., S. V. Yelamanchili and H. S. Fox (2013). "MicroRNA-142 reduces monoamine oxidase A expression and activity in neuronal cells by downregulating SIRT1." PLoS One **8**(11): e79579.

Chen, L., W. Zhang, J. He, Q. Dong, F. Li and H. Li (2011). "Aberrant expression profiles of isoproterenol-induced endoplasmic reticulum stress response genes in mouse myocardium." J Biochem Mol Toxicol **25**(6): 382-385.

Chen, P. S., B. Joung, T. Shinohara, M. Das, Z. Chen and S. F. Lin (2010). "The initiation of the heart beat." Circ J **74**(2): 221-225.

Chen, W. Y., D. H. Wang, R. C. Yen, J. Luo, W. Gu and S. B. Baylin (2005). "Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses." Cell **123**(3): 437-448.

Cheng, H. L., R. Mostoslavsky, S. Saito, J. P. Manis, Y. Gu, P. Patel, R. Bronson, E. Appella, F. W. Alt and K. F. Chua (2003). "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10794-10799.



Chinnadurai, G. (2002). "CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis." Mol Cell **9**(2): 213-224.

Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons and D. R. Green (2010). "The BCL-2 family reunion." Mol Cell **37**(3): 299-310.

Chou, H. C. and H. L. Chan (2014). "5-Methoxytryptophan-dependent protection of cardiomyocytes from heart ischemia reperfusion injury." Arch Biochem Biophys **543**: 15-22.

Cleland, J. G., M. J. Calvert, Y. Verboven and N. Freemantle (2009). "Effects of cardiac resynchronization therapy on long-term quality of life: an analysis from the CARDiac Resynchronisation-Heart Failure (CARE-HF) study." Am Heart J **157**(3): 457-466.

Cohen, J. J. (1993). "Apoptosis." Immunol Today **14**(3): 126-130.

Collins, T. J., M. J. Berridge, P. Lipp and M. D. Bootman (2002). "Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells." EMBO J **21**(7): 1616-1627.

Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-204.

Colman, R. J., T. M. Beasley, J. W. Kemnitz, S. C. Johnson, R. Weindruch and R. M. Anderson (2014). "Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys." Nat Commun **5**: 3557.

Csordas, G., A. P. Thomas and G. Hajnoczky (1999). "Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria." EMBO J **18**(1): 96-108.

Cullinan, S. B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R. J. Kaufman and J. A. Diehl (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7198-7209.

Dai, J. M., Z. Y. Wang, D. C. Sun, R. X. Lin and S. Q. Wang (2007). "SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity." J Cell Physiol **210**(1): 161-166.

Dalal, S., C. R. Foster, B. C. Das, M. Singh and K. Singh (2012). "Beta-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis." Mol Cell Biochem **364**(1-2): 59-70.

Dally, S., V. Monceau, E. Corvazier, R. Bredoux, A. Raies, R. Bobe, F. del Monte and J. Enouf (2009). "Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart." Cell Calcium **45**(2): 144-154.

De Sousa, E., V. Veksler, A. Minajeva, A. Kaasik, P. Mateo, E. Mayoux, J. Hoerter, X. Bigard, B. Serrurier and R. Ventura-Clapier (1999). "Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure." Circ Res **85**(1): 68-76.

Deegan, S., S. Saveljeva, A. M. Gorman and A. Samali (2013). "Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress." Cell Mol Life Sci **70**(14): 2425-2441.

Deniaud, A., O. Sharaf el dein, E. Maillier, D. Poncet, G. Kroemer, C. Lemaire and C. Brenner (2008). "Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis." Oncogene **27**(3): 285-299.

Dey, M., A. Velyvis, J. J. Li, E. Chiu, D. Chiovitti, L. E. Kay, F. Sicheri and T. E. Dever (2011). "Requirement for kinase-induced conformational change in eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) restricts phosphorylation of Ser51." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4316-4321.

Diguet, N., Y. Mallat, R. Ladouce, G. Clodic, A. Prola, E. Tritsch, J. Blanc, J. C. Larcher, C. Delcayre, J. L. Samuel, B. Friguet, G. Bolbach, Z. Li and M. Mericskay (2011). "Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy." J Biol Chem **286**(40): 35007-35019.

Dioum, E. M., R. Chen, M. S. Alexander, Q. Zhang, R. T. Hogg, R. D. Gerard and J. A. Garcia (2009). "Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1." Science **324**(5932): 1289-1293.

Dong, S., Z. Teng, F. H. Lu, Y. J. Zhao, H. Li, H. Ren, H. Chen, Z. W. Pan, Y. J. Lv, B. F. Yang, Y. Tian, C. Q. Xu and W. H. Zhang (2010). "Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC(epsilon)-interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk." Mol Cell Biochem **341**(1-2): 195-206.

Donnelly, N., A. M. Gorman, S. Gupta and A. Samali (2013). "The eIF2alpha kinases: their structures and functions." Cell Mol Life Sci **70**(19): 3493-3511.

Doroudgar, S., D. J. Thuerlauf, M. C. Marcinko, P. J. Belmont and C. C. Glembotski (2009). "Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response." J Biol Chem **284**(43): 29735-29745.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.

Duan, Q., X. Wang, W. Gong, L. Ni, C. Chen, X. He, F. Chen, L. Yang, P. Wang and D. W. Wang (2012). "ER stress negatively modulates the expression of the miR-199a/214 cluster to regulates tumor survival and progression in human hepatocellular cancer." PLoS One **7**(2): e31518.

Dzeja, P. and A. Terzic (2009). "Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing." Int J Mol Sci **10**(4): 1729-1772.

- Dzeja, P. P., K. T. Vitkevicius, M. M. Redfield, J. C. Burnett and A. Terzic (1999). "Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure." Circ Res **84**(10): 1137-1143.
- Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M. M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra and R. J. Youle (2011). "Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol." Cell **145**(1): 104-116.
- Evans, E. A., R. Gilmore and G. Blobel (1986). "Purification of microsomal signal peptidase as a complex." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(3): 581-585.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.
- Fan, H., H. C. Yang, L. You, Y. Y. Wang, W. J. He and C. M. Hao (2013). "The histone deacetylase, SIRT1, contributes to the resistance of young mice to ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury." Kidney Int **83**(3): 404-413.
- Fan, W. and J. Luo (2010). "SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA." Mol Cell **39**(2): 247-258.
- Fang, D. L., Y. Wan, W. Shen, J. Cao, Z. X. Sun, H. H. Yu, Q. Zhang, W. H. Cheng, J. Chen and B. Ning (2013). "Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells." Mol Cell Biochem **381**(1-2): 127-137.
- Forbes, M. S. and N. Sperelakis (1985). "Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function." Tissue Cell **17**(5): 605-648.
- Force, T. and R. Kerkela (2008). "Cardiotoxicity of the new cancer therapeutics--mechanisms of, and approaches to, the problem." Drug Discov Today **13**(17-18): 778-784.
- Ford, J., S. Ahmed, S. Allison, M. Jiang and J. Milner (2008). "JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability." Cell Cycle **7**(19): 3091-3097.
- Frey, T. G. and C. A. Mannella (2000). "The internal structure of mitochondria." Trends Biochem Sci **25**(7): 319-324.
- Friedman, J. R., B. M. Webster, D. N. Mastronarde, K. J. Verhey and G. K. Voeltz (2010). "ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules." J Cell Biol **190**(3): 363-375.
- Frohman, M. A. (2010). "Mitochondria as integrators of signal transduction and energy production in cardiac physiology and disease." J Mol Med (Berl) **88**(10): 967-970.
- Fu, H. Y., T. Minamino, O. Tsukamoto, T. Sawada, M. Asai, H. Kato, Y. Asano, M. Fujita, S. Takashima, M. Hori and M. Kitakaze (2008). "Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition." Cardiovasc Res **79**(4): 600-610.

Fu, H. Y., K. Okada, Y. Liao, O. Tsukamoto, T. Isomura, M. Asai, T. Sawada, K. Okuda, Y. Asano, S. Sanada, H. Asanuma, M. Asakura, S. Takashima, I. Komuro, M. Kitakaze and T. Minamino (2010). "Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload." Circulation **122**(4): 361-369.

Fulco, M., Y. Cen, P. Zhao, E. P. Hoffman, M. W. McBurney, A. A. Sauve and V. Sartorelli (2008). "Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt." Dev Cell **14**(5): 661-673.

Gallerne, C., A. Prola and C. Lemaire (2013). "Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2." Biochim Biophys Acta **1833**(6): 1356-1366.

Gan, R., G. Hu, Y. Zhao, H. Li, Z. Jin, H. Ren, S. Dong, X. Zhong, H. Li, B. Yang, C. Xu, F. Lu and W. Zhang (2012). "Post-conditioning protecting rat cardiomyocytes from apoptosis via attenuating calcium-sensing receptor-induced endo(sarco)plasmic reticulum stress." Mol Cell Biochem **361**(1-2): 123-134.

Gao, P., T. T. Xu, J. Lu, L. Li, J. Xu, D. L. Hao, H. Z. Chen and D. P. Liu (2014). "Overexpression of SIRT1 in vascular smooth muscle cells attenuates angiotensin II-induced vascular remodeling and hypertension in mice." J Mol Med (Berl) **92**(4): 347-357.

Gao, Z., J. Zhang, I. Kheterpal, N. Kennedy, R. J. Davis and J. Ye (2011). "Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity." J Biol Chem **286**(25): 22227-22234.

Garcia-Martinez, V., D. Macias, Y. Ganan, J. M. Garcia-Lobo, M. V. Francia, M. A. Fernandez-Teran and J. M. Hurlé (1993). "Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud." J Cell Sci **106** ( Pt 1): 201-208.

Garnier, A., D. Fortin, C. Delomenie, I. Momken, V. Veksler and R. Ventura-Clapier (2003). "Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles." J Physiol **551**(Pt 2): 491-501.

Garnier, A., J. Zoll, D. Fortin, B. N'Guessan, F. Lefebvre, B. Geny, B. Mettauer, V. Veksler and R. Ventura-Clapier (2009). "Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II." Circ Heart Fail **2**(4): 342-350.

George, I., H. N. Sabbah, K. Xu, N. Wang and J. Wang (2011). "beta-adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines." Cardiovasc Res **91**(3): 447-455.

Gerhart-Hines, Z., J. E. Dominy, Jr., S. M. Blattler, M. P. Jedrychowski, A. S. Banks, J. H. Lim, H. Chim, S. P. Gygi and P. Puigserver (2011). "The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+)." Mol Cell **44**(6): 851-863.

Gething, M. J. (1999). "Role and regulation of the ER chaperone BiP." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 465-472.

Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea and J. S. Weissman (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature **425**(6959): 737-741.

Gheorghiade, M., R. J. Cody, G. S. Francis, W. J. McKenna, J. B. Young and R. O. Bonow (2000). "Current medical therapy for advanced heart failure." Heart Lung **29**(1): 16-32.

Ghosh, H. S., B. Reizis and P. D. Robbins (2011). "SIRT1 associates with eIF2-alpha and regulates the cellular stress response." Sci Rep **1**: 150.

Giorgio, V., S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G. D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabo, G. Lippe and P. Bernardi (2013). "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5887-5892.

Gorlich, D., E. Hartmann, S. Prehn and T. A. Rapoport (1992). "A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation." Nature **357**(6373): 47-52.

Gorlich, D., S. Prehn, E. Hartmann, K. U. Kalies and T. A. Rapoport (1992). "A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation." Cell **71**(3): 489-503.

Gorlich, D. and T. A. Rapoport (1993). "Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane." Cell **75**(4): 615-630.

Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori and M. Mori (2002). "Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP." J Biol Chem **277**(14): 12343-12350.

Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang (2001). "The origin and early evolution of mitochondria." Genome Biol **2**(6): REVIEWS1018.

Gu, C., Y. Xing, L. Jiang, M. Chen, M. Xu, Y. Yin, C. Li, Z. Yang, L. Yu and H. Ma (2013). "Impaired cardiac SIRT1 activity by carbonyl stress contributes to aging-related ischemic intolerance." PLoS One **8**(9): e74050.

Gu, X. S., Z. B. Wang, Z. Ye, J. P. Lei, L. Li, D. F. Su and X. Zheng (2014). "Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure." Genet Mol Res **13**(1): 323-335.

Guan, H. S., H. J. Shangguan, Z. Shang, L. Yang, X. M. Meng and S. B. Qiao (2011). "Endoplasmic reticulum stress caused by left ventricular hypertrophy in rats: effects of telmisartan." Am J Med Sci **342**(4): 318-323.

- Gueguen, C., B. Palmier, M. Plotkine, C. Marchand-Leroux and V. C. Bessson (2014). "Neurological and histological consequences induced by in vivo cerebral oxidative stress: evidence for beneficial effects of SRT1720, a sirtuin 1 activator, and sirtuin 1-mediated neuroprotective effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition." PLoS One **9**(2): e87367.
- Guerra, S., A. Leri, X. Wang, N. Finato, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, J. Kajstura and P. Anversa (1999). "Myocyte death in the failing human heart is gender dependent." Circ Res **85**(9): 856-866.
- Guo, X., J. G. Williams, T. T. Schug and X. Li (2010). "DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1." J Biol Chem **285**(17): 13223-13232.
- Gurd, B. J., Y. Yoshida, J. T. McFarlan, G. P. Holloway, C. D. Moyes, G. J. Heigenhauser, L. Spriet and A. Bonen (2011). "Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(1): R67-75.
- Haigis, M. C. and D. A. Sinclair (2010). "Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance." Annu Rev Pathol **5**: 253-295.
- Hamada, H., M. Suzuki, S. Yuasa, N. Mimura, N. Shinozuka, Y. Takada, M. Suzuki, T. Nishino, H. Nakaya, H. Koseki and T. Aoe (2004). "Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice." Mol Cell Biol **24**(18): 8007-8017.
- Hamburger, V., J. K. Brunso-Bechtold and J. W. Yip (1981). "Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor." J Neurosci **1**(1): 60-71.
- Hammond, C., I. Braakman and A. Helenius (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 913-917.
- Han, L., G. Zhao, H. Wang, T. Tong and J. Chen (2014). "Calorie restriction upregulated sirtuin 1 by attenuating its ubiquitin degradation in cancer cells." Clin Exp Pharmacol Physiol **41**(3): 165-168.
- Han, L., R. Zhou, J. Niu, M. A. McNutt, P. Wang and T. Tong (2010). "SIRT1 is regulated by a PPAR $\gamma$ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence." Nucleic Acids Res **38**(21): 7458-7471.
- Harding, H. P., Y. Zhang and D. Ron (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-274.
- Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-633.



Hayashida, S., A. Arimoto, Y. Kuramoto, T. Kozako, S. Honda, H. Shimeno and S. Soeda (2010). "Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR $\alpha$  in mice." Mol Cell Biochem **339**(1-2): 285-292.

Hayes, J. D., S. A. Chanas, C. J. Henderson, M. McMahon, C. Sun, G. J. Moffat, C. R. Wolf and M. Yamamoto (2000). "The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin." Biochem Soc Trans **28**(2): 33-41.

Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-438.

Heifetz, A., R. W. Keenan and A. D. Elbein (1979). "Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase." Biochemistry **18**(11): 2186-2192.

Hessenauer, A., C. C. Schneider, C. Gotz and M. Montenarh (2011). "CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response." Cell Signal **23**(1): 145-151.

Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 89-102.

Hetz, C., E. Chevet and H. P. Harding (2013). "Targeting the unfolded protein response in disease." Nat Rev Drug Discov **12**(9): 703-719.

Hitomi, J., T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, T. Manabe, S. Yamagishi, Y. Bando, K. Imaizumi, Y. Tsujimoto and M. Tohyama (2004). "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death." J Cell Biol **165**(3): 347-356.

Ho, A. T., Q. H. Li, H. Okada, T. W. Mak and E. Zacksenhaus (2007). "XIAP activity dictates Apaf-1 dependency for caspase 9 activation." Mol Cell Biol **27**(16): 5673-5685.

Hoffmann, E., J. Wald, S. Lavu, J. Roberts, C. Beaumont, J. Haddad, P. Elliott, C. Westphal and E. Jacobson (2013). "Pharmacokinetics and tolerability of SRT2104, a first-in-class small molecule activator of SIRT1, after single and repeated oral administration in man." Br J Clin Pharmacol **75**(1): 186-196.

Hollien, J., J. H. Lin, H. Li, N. Stevens, P. Walter and J. S. Weissman (2009). "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells." J Cell Biol **186**(3): 323-331.

Hom, J. and S. S. Sheu (2009). "Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells." J Mol Cell Cardiol **46**(6): 811-820.

Houtkooper, R. H., C. Canto, R. J. Wanders and J. Auwerx (2010). "The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways." Endocr Rev **31**(2): 194-223.



Hsu, C. P., P. Zhai, T. Yamamoto, Y. Maejima, S. Matsushima, N. Hariharan, D. Shao, H. Takagi, S. Oka and J. Sadoshima (2010). "Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion." Circulation **122**(21): 2170-2182.

Hubbard, B. P., A. P. Gomes, H. Dai, J. Li, A. W. Case, T. Considine, T. V. Riera, J. E. Lee, S. Y. E, D. W. Lamming, B. L. Pentelute, E. R. Schuman, L. A. Stevens, A. J. Ling, S. M. Armour, S. Michan, H. Zhao, Y. Jiang, S. M. Sweitzer, C. A. Blum, J. S. Disch, P. Y. Ng, K. T. Howitz, A. P. Rolo, Y. Hamuro, J. Moss, R. B. Perni, J. L. Ellis, G. P. Vlasuk and D. A. Sinclair (2013). "Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators." Science **339**(6124): 1216-1219.

Hubbard, B. P. and D. A. Sinclair (2014). "Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases." Trends Pharmacol Sci **35**(3): 146-154.

Hudsmith, L. E. and S. Neubauer (2008). "Detection of myocardial disorders by magnetic resonance spectroscopy." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5 Suppl 2**: S49-56.

Huss, J. M., I. P. Torra, B. Staels, V. Giguere and D. P. Kelly (2004). "Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle." Mol Cell Biol **24**(20): 9079-9091.

Huxley, A. F. (1957). "Muscle structure and theories of contraction." Prog Biophys Biophys Chem **7**: 255-318.

Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaeberlein and L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." Nature **403**(6771): 795-800.

Ireland, B. S., M. Niggemann and D. B. Williams (2006). "In vitro assays of the functions of calnexin and calreticulin, lectin chaperones of the endoplasmic reticulum." Methods Mol Biol **347**: 331-342.

Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev **13**(1): 76-86.

Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-354.

Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre and B. M. Spiegelman (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12017-12022.

Jarmi, T. and A. Agarwal (2009). "Heme oxygenase and renal disease." Curr Hypertens Rep **11**(1): 56-62.

Jarosch, E., U. Lenk and T. Sommer (2003). "Endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Int Rev Cytol **223**: 39-81.

Javadov, S. and M. Karmazyn (2007). "Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection." Cell Physiol Biochem **20**(1-4): 1-22.

Jazbutyte, V. (2010). "Mitochondrial dynamics: molecular mechanisms and the role in the heart." Minerva Cardioangiol **58**(2): 231-239.

Jeong, J., K. Juhn, H. Lee, S. H. Kim, B. H. Min, K. M. Lee, M. H. Cho, G. H. Park and K. H. Lee (2007). "SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70." Exp Mol Med **39**(1): 8-13.

Jimbo, A., E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, K. Sakamaki, S. Yonehara and T. Momoi (2003). "ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation." Exp Cell Res **283**(2): 156-166.

Johnson, A. E. and M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 799-842.

Joly-Amado, A., R. G. Denis, J. Castel, A. Lacombe, C. Cansell, C. Rouch, N. Kassis, J. Dairou, P. D. Cani, R. Ventura-Clapier, A. Prola, M. Flamment, F. Foufelle, C. Magnan and S. Luquet (2012). "Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning." EMBO J **31**(22): 4276-4288.

Joubert, F., J. R. Wilding, D. Fortin, V. Domergue-Dupont, M. Novotova, R. Ventura-Clapier and V. Veksler (2008). "Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure." J Physiol **586**(Pt 21): 5181-5192.

Kaakinen, M., H. Papponen and K. Metsikko (2008). "Microdomains of endoplasmic reticulum within the sarcoplasmic reticulum of skeletal myofibers." Exp Cell Res **314**(2): 237-245.

Kaasik, A., M. Kuum, F. Joubert, J. Wilding, R. Ventura-Clapier and V. Veksler (2010). "Mitochondria as a source of mechanical signals in cardiomyocytes." Cardiovasc Res **87**(1): 83-91.

Kaasik, A., V. Veksler, E. Boehm, M. Novotova, A. Minajeva and R. Ventura-Clapier (2001). "Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization." Circ Res **89**(2): 153-159.

Kaisto, T. and K. Metsikko (2003). "Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers." Exp Cell Res **289**(1): 47-57.

Kajstura, J., N. Gurusamy, B. Ogorek, P. Goichberg, C. Clavo-Rondon, T. Hosoda, D. D'Amario, S. Bardelli, A. P. Beltrami, D. Cesselli, R. Bussani, F. del Monte, F. Quaini, M. Rota, C. A. Beltrami, B. A. Buchholz, A. Leri and P. Anversa (2010). "Myocyte turnover in the aging human heart." Circ Res **107**(11): 1374-1386.

Kajstura, J., K. Urbanek, S. Perl, T. Hosoda, H. Zheng, B. Ogorek, J. Ferreira-Martins, P. Goichberg, C. Rondon-Clavo, F. Sanada, D. D'Amario, M. Rota, F. Del Monte, D. Orlic, J. Tisdale, A. Leri and P. Anversa (2010). "Cardiomyogenesis in the adult human heart." Circ Res **107**(2): 305-315.

Kalai, M., M. Lamkanfi, G. Denecker, M. Boogmans, S. Lippens, A. Meeus, W. Declercq and P. Vandenabeele (2003). "Regulation of the expression and processing of caspase-12." J Cell Biol **162**(3): 457-467.

Kang, H., J. W. Jung, M. K. Kim and J. H. Chung (2009). "CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA-damage." PLoS One **4**(8): e6611.

Kang, H., J. Y. Suh, Y. S. Jung, J. W. Jung, M. K. Kim and J. H. Chung (2011). "Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity." Mol Cell **44**(2): 203-213.

Katto, J., N. Engel, W. Abbas, G. Herbein and U. Mahlknecht (2013). "Transcription factor NFkappaB regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1." Clin Epigenetics **5**(1): 11.

Kawai, Y., L. Garduno, M. Theodore, J. Yang and I. J. Arinze (2011). "Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization." J Biol Chem **286**(9): 7629-7640.

Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol **8**(8): 324-330.

Keller, S. H., O. Platoshyn and J. X. Yuan (2005). "Long QT syndrome-associated I593R mutation in HERG potassium channel activates ER stress pathways." Cell Biochem Biophys **43**(3): 365-377.

Kerkela, R., L. Grazette, R. Yacobi, C. Iliescu, R. Patten, C. Beahm, B. Walters, S. Shevtsov, S. Pesant, F. J. Clubb, A. Rosenzweig, R. N. Salomon, R. A. Van Etten, J. Alroy, J. B. Durand and T. Force (2006). "Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate." Nat Med **12**(8): 908-916.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kim, D., M. D. Nguyen, M. M. Dobbin, A. Fischer, F. Sananbenesi, J. T. Rodgers, I. Delalle, J. A. Baur, G. Sui, S. M. Armour, P. Puigserver, D. A. Sinclair and L. H. Tsai (2007). "SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis." EMBO J **26**(13): 3169-3179.

Kim, D. S., K. C. Ha, D. Y. Kwon, M. S. Kim, H. R. Kim, S. W. Chae and H. J. Chae (2008). "Kaempferol protects ischemia/reperfusion-induced cardiac damage through the regulation of endoplasmic reticulum stress." Immunopharmacol Immunotoxicol **30**(2): 257-270.

- Kim, E. J., J. H. Kho, M. R. Kang and S. J. Um (2007). "Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity." Mol Cell **28**(2): 277-290.
- Kim, H. J., A. R. Raphael, E. S. LaDow, L. McGurk, R. A. Weber, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, S. Finkbeiner, A. D. Gitler and N. M. Bonini (2014). "Therapeutic modulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models." Nat Genet **46**(2): 152-160.
- Kim, H. S., A. Vassilopoulos, R. H. Wang, T. Lahusen, Z. Xiao, X. Xu, C. Li, T. D. Veenstra, B. Li, H. Yu, J. Ji, X. W. Wang, S. H. Park, Y. I. Cha, D. Gius and C. X. Deng (2011). "SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity." Cancer Cell **20**(4): 487-499.
- Kim, J. E., J. Chen and Z. Lou (2008). "DBC1 is a negative regulator of SIRT1." Nature **451**(7178): 583-586.
- Klar, A. J., S. Fogel and K. Macleod (1979). "MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE." Genetics **93**(1): 37-50.
- Klein, L., C. M. O'Connor, W. A. Gattis, M. Zampino, L. de Luca, A. Vitarelli, F. Fedele and M. Gheorghiade (2003). "Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations." Am J Cardiol **91**(9A): 18F-40F.
- Knight, J. R., S. J. Allison and J. Milner (2013). "Active regulator of SIRT1 is required for cancer cell survival but not for SIRT1 activity." Open Biol **3**(11): 130130.
- Kornberg, M. D., N. Sen, M. R. Hara, K. R. Juluri, J. V. Nguyen, A. M. Snowman, L. Law, L. D. Hester and S. H. Snyder (2010). "GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins." Nat Cell Biol **12**(11): 1094-1100.
- Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Kuznetsov, A. V. and R. Margreiter (2009). "Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity." Int J Mol Sci **10**(4): 1911-1929.
- Lan, F., J. M. Cacicedo, N. Ruderman and Y. Ido (2008). "SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation." J Biol Chem **283**(41): 27628-27635.
- Landry, J., J. T. Slama and R. Sternglanz (2000). "Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 685-690.
- Lange, S., D. Auerbach, P. McLoughlin, E. Perriard, B. W. Schafer, J. C. Perriard and E. Ehler (2002). "Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4925-4936.

Latreille, M. and L. Larose (2006). "Nck in a complex containing the catalytic subunit of protein phosphatase 1 regulates eukaryotic initiation factor 2alpha signaling and cell survival to endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem **281**(36): 26633-26644.

Laurent, G., V. C. de Boer, L. W. Finley, M. Sweeney, H. Lu, T. T. Schug, Y. Cen, S. M. Jeong, X. Li, A. A. Sauve and M. C. Haigis (2013). "SIRT4 represses peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity to suppress hepatic fat oxidation." Mol Cell Biol **33**(22): 4552-4561.

Lavrik, I. N., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-2672.

Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, K. C. Anderson and L. H. Glimcher (2003). "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9946-9951.

Lee, J. S., Z. Zheng, R. Mendez, S. W. Ha, Y. Xie and K. Zhang (2012). "Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model." Toxicol Lett **211**(1): 29-38.

Lehman, J. J., P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros and D. P. Kelly (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." J Clin Invest **106**(7): 847-856.

Leu, M., E. Ehler and J. C. Perriard (2001). "Characterisation of postnatal growth of the murine heart." Anat Embryol (Berl) **204**(3): 217-224.

Li, K., A. Casta, R. Wang, E. Lozada, W. Fan, S. Kane, Q. Ge, W. Gu, D. Orren and J. Luo (2008). "Regulation of WRN protein cellular localization and enzymatic activities by SIRT1-mediated deacetylation." J Biol Chem **283**(12): 7590-7598.

Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-99.

Li, X. H., C. Chen, Y. Tu, H. T. Sun, M. L. Zhao, S. X. Cheng, Y. Qu and S. Zhang (2013). "Sirt1 promotes axonogenesis by deacetylation of Akt and inactivation of GSK3." Mol Neurobiol **48**(3): 490-499.

Li, Y., W. Zhu, J. Tao, P. Xin, M. Liu, J. Li and M. Wei (2012). "Fasudil protects the heart against ischemia-reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress and modulating SERCA activity: the differential role for PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathways." PLoS One **7**(10): e48115.

Li, Z., T. Zhang, H. Dai, G. Liu, H. Wang, Y. Sun, Y. Zhang and Z. Ge (2008). "Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats." J Endocrinol **196**(3): 565-572.

Libri, V., A. P. Brown, G. Gambarota, J. Haddad, G. S. Shields, H. Dawes, D. J. Pinato, E. Hoffman, P. J. Elliot, G. P. Vlasuk, E. Jacobson, M. R. Wilkins and P. M. Matthews (2012). "A pilot randomized, placebo controlled, double blind phase I trial of the novel SIRT1 activator SRT2104 in elderly volunteers." PLoS One **7**(12): e51395.

Liesa, M., M. Palacin and A. Zorzano (2009). "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease." Physiol Rev **89**(3): 799-845.

Lim, J. H., Y. M. Lee, Y. S. Chun, J. Chen, J. E. Kim and J. W. Park (2010). "Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha." Mol Cell **38**(6): 864-878.

Lin, C. J., T. H. Chen, L. Y. Yang and C. M. Shih (2014). "Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death." Cell Death Dis **5**: e1147.

Lin, S. J., P. A. Defossez and L. Guarente (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **289**(5487): 2126-2128.

Lin, Z. F., H. B. Xu, J. Y. Wang, Q. Lin, Z. Ruan, F. B. Liu, W. Jin, H. H. Huang and X. Chen (2013). "SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS." Biochem Biophys Res Commun **441**(1): 191-195.

Liu, B., W. Che, J. Xue, C. Zheng, K. Tang, J. Zhang, J. Wen and Y. Xu (2013). "SIRT4 prevents hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells." Cell Physiol Biochem **32**(3): 655-662.

Liu, B., W. Che, C. Zheng, W. Liu, J. Wen, H. Fu, K. Tang, J. Zhang and Y. Xu (2013). "SIRT5: a safeguard against oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes." Cell Physiol Biochem **32**(4): 1050-1059.

Liu, C. L., X. Li, G. L. Hu, R. J. Li, Y. Y. He, W. Zhong, S. Li, K. L. He and L. L. Wang (2012). "Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2alpha signaling pathway." J Geriatr Cardiol **9**(3): 258-268.

Liu, C. M., R. Y. Wang, Saijilafu, Z. X. Jiao, B. Y. Zhang and F. Q. Zhou (2013). "MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration." Genes Dev **27**(13): 1473-1483.

Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**(1): 147-157.

Liu, X., D. Wang, Y. Zhao, B. Tu, Z. Zheng, L. Wang, H. Wang, W. Gu, R. G. Roeder and W. G. Zhu (2011). "Methyltransferase Set7/9 regulates p53 activity by interacting with Sirtuin 1 (SIRT1)." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 1925-1930.

Liu, X. H., Z. Y. Zhang, S. Sun and X. D. Wu (2008). "Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress." Shock **30**(4): 422-427.

Liu, Y., J. Wang, S. Y. Qi, L. S. Ru, C. Ding, H. J. Wang, J. S. Zhao, J. J. Li, A. Y. Li and D. M. Wang (2014). "Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways." Can J Cardiol **30**(3): 368-375.



Lucken-Ardjomande, S. and J. C. Martinou (2005). "Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization." J Cell Sci **118**(Pt 3): 473-483.

Luo, J., A. Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente and W. Gu (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." Cell **107**(2): 137-148.

Ma, H., K. R. Jones, R. Guo, P. Xu, Y. Shen and J. Ren (2010). "Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress." Clin Exp Pharmacol Physiol **37**(4): 460-465.

Mallat, Y., E. Tritsch, R. Ladouce, D. L. Winter, B. Friguet, Z. Li and M. Mericskay (2014). "Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by microRNAs miR-378 and miR-378." Mol Cell Proteomics **13**(1): 18-29.

Mannherz, H. G. and R. S. Goody (1976). "Proteins of contractile systems." Annu Rev Biochem **45**: 427-465.

Mao, W., S. Fukuoka, C. Iwai, J. Liu, V. K. Sharma, S. S. Sheu, M. Fu and C. S. Liang (2007). "Cardiomyocyte apoptosis in autoimmune cardiomyopathy: mediated via endoplasmic reticulum stress and exaggerated by norepinephrine." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1636-1645.

Mao, W., C. Iwai, J. Liu, S. S. Sheu, M. Fu and C. S. Liang (2008). "Darbepoetin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of the PI3K/Akt and STAT3 pathways." J Mol Cell Cardiol **45**(2): 250-260.

Martindale, J. J., R. Fernandez, D. Thuerauf, R. Whittaker, N. Gude, M. A. Sussman and C. C. Glembotski (2006). "Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6." Circ Res **98**(9): 1186-1193.

Martinou, J. C. and R. J. Youle (2006). "Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission?" Cell Death Differ **13**(8): 1291-1295.

Maurel, M. and E. Chevet (2013). "Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection." Am J Physiol Cell Physiol **304**(12): C1117-1126.

McBurney, M. W., X. Yang, K. Jardine, M. Hixon, K. Boekelheide, J. R. Webb, P. M. Lansdorp and M. Lemieux (2003). "The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis." Mol Cell Biol **23**(1): 38-54.

McCracken, A. A. and J. L. Brodsky (2005). "Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival." Curr Top Microbiol Immunol **300**: 17-40.

McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw and N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol **21**(4): 1249-1259.



McFarland, T. P., M. L. Milstein and S. E. Cala (2010). "Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **49**(4): 556-564.

Melnick, J., J. L. Dul and Y. Argon (1994). "Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum." Nature **370**(6488): 373-375.

Mesaeli, N., K. Nakamura, E. Zvaritch, P. Dickie, E. Dziak, K. H. Krause, M. Opas, D. H. MacLennan and M. Michalak (1999). "Calreticulin is essential for cardiac development." J Cell Biol **144**(5): 857-868.

Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochem J **404**(1): 1-13.

Minamino, T. and M. Kitakaze (2010). "ER stress in cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol **48**(6): 1105-1110.

Miyazaki, Y., K. Kaikita, M. Endo, E. Horio, M. Miura, K. Tsujita, S. Hokimoto, M. Yamamuro, T. Iwawaki, T. Gotoh, H. Ogawa and Y. Oike (2011). "C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(5): 1124-1132.

Mootha, V. K., C. Handschin, D. Arlow, X. Xie, J. St Pierre, S. Sihag, W. Yang, D. Altshuler, P. Puigserver, N. Patterson, P. J. Willy, I. G. Schulman, R. A. Heyman, E. S. Lander and B. M. Spiegelman (2004). "Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6570-6575.

Morishima, N., K. Nakanishi and A. Nakano (2011). "Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1." J Biol Chem **286**(40): 35227-35235.

Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata and Y. Yasuhiko (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**(37): 34287-34294.

Mortuza, R., B. Feng and S. Chakrabarti (2014). "miR-195 regulates SIRT1-mediated changes in diabetic retinopathy." Diabetologia **57**(5): 1037-1046.

Mouli, P. K., G. Twig and O. S. Shirihai (2009). "Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function." Biophys J **96**(9): 3509-3518.

Mudd, J. O. and D. A. Kass (2008). "Tackling heart failure in the twenty-first century." Nature **451**(7181): 919-928.

Nagai, K., C. Oubridge, A. Kuglstatter, E. Menichelli, C. Isel and L. Jovine (2003). "Structure, function and evolution of the signal recognition particle." EMBO J **22**(14): 3479-3485.

- Nakagawa, T. and J. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 887-894.
- Nakahata, Y., M. Kaluzova, B. Grimaldi, S. Sahar, J. Hirayama, D. Chen, L. P. Guarente and P. Sassone-Corsi (2008). "The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control." Cell **134**(2): 329-340.
- Namba, T., T. Ishihara, K. Tanaka, T. Hoshino and T. Mizushima (2007). "Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors." Biochem Biophys Res Commun **355**(2): 543-548.
- Nascimben, L., J. S. Ingwall, B. H. Lorell, I. Pinz, V. Schultz, K. Tornheim and R. Tian (2004). "Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart." Hypertension **44**(5): 662-667.
- Nasrin, N., V. K. Kaushik, E. Fortier, D. Wall, K. J. Pearson, R. de Cabo and L. Bordone (2009). "JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity." PLoS One **4**(12): e8414.
- Natarajan, R., F. N. Salloum, B. J. Fisher, L. Smithson, J. Almenara and A. A. Fowler, 3rd (2009). "Prolyl hydroxylase inhibition attenuates post-ischemic cardiac injury via induction of endoplasmic reticulum stress genes." Vascul Pharmacol **51**(2-3): 110-118.
- Nemoto, S., M. M. Fergusson and T. Finkel (2004). "Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway." Science **306**(5704): 2105-2108.
- Neubauer, S. (2007). "The failing heart--an engine out of fuel." N Engl J Med **356**(11): 1140-1151.
- Neubauer, S., M. Horn, M. Cramer, K. Harre, J. B. Newell, W. Peters, T. Pabst, G. Ertl, D. Hahn, J. S. Ingwall and K. Kochsiek (1997). "Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy." Circulation **96**(7): 2190-2196.
- Newton, K., J. M. Hildebrand, Z. Shen, D. Rodriguez, S. Alvarez-Diaz, S. Petersen, S. Shah, D. L. Dugger, C. Huang, J. Auwerx, P. Vandenabeele, D. R. Green, A. Ashkenazi, V. M. Dixit, W. J. Kaiser, A. Strasser, A. Degterev and J. Silke (2014). "Is SIRT2 required for necroptosis?" Nature **506**(7489): E4-6.
- Ngoh, G. A., T. Hamid, S. D. Prabhu and S. P. Jones (2009). "O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(5): H1711-1719.
- Nguyen, M., D. G. Millar, V. W. Yong, S. J. Korsmeyer and G. C. Shore (1993). "Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence." J Biol Chem **268**(34): 25265-25268.
- Ni, L., C. Zhou, Q. Duan, J. Lv, X. Fu, Y. Xia and D. W. Wang (2011). "beta-AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure." PLoS One **6**(11): e27294.

Ni, M., H. Zhou, S. Wey, P. Baumeister and A. S. Lee (2009). "Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP." PLoS One **4**(8): e6868.

Nika, J., S. Rippel and E. M. Hannig (2001). "Biochemical analysis of the eIF2beta gamma complex reveals a structural function for eIF2alpha in catalyzed nucleotide exchange." J Biol Chem **276**(2): 1051-1056.

Nin, V., C. Escande, C. C. Chini, S. Giri, J. Camacho-Pereira, J. Matalonga, Z. Lou and E. N. Chini (2012). "Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **287**(28): 23489-23501.

Nisoli, E., C. Tonello, A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, S. Falcone, A. Valerio, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada and M. O. Carruba (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-317.

Ohlmann, T. D., E; López-Lastra, M; Deffaud, C; Bouchardon, A; Darlix, JL (2000). "L'initiation de la synthèse des protéines chez les eucaryotes." médecine/sciences **16**(Janvier): 77-86.

Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki and H. Hayashi (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." EMBO J **24**(6): 1243-1255.

Okada, K., T. Minamino, Y. Tsukamoto, Y. Liao, O. Tsukamoto, S. Takashima, A. Hirata, M. Fujita, Y. Nagamachi, T. Nakatani, C. Yutani, K. Ozawa, S. Ogawa, H. Tomoike, M. Hori and M. Kitakaze (2004). "Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis." Circulation **110**(6): 705-712.

Okazaki, M., Y. Iwasaki, M. Nishiyama, T. Taguchi, M. Tsugita, S. Nakayama, M. Kambayashi, K. Hashimoto and Y. Terada (2010). "PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1." Endocr J **57**(5): 403-413.

Olivetti, G., R. Abbi, F. Quaini, J. Kajstura, W. Cheng, J. A. Nitahara, E. Quaini, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, S. Krajewski, J. C. Reed and P. Anversa (1997). "Apoptosis in the failing human heart." N Engl J Med **336**(16): 1131-1141.

Olmos, Y., F. J. Sanchez-Gomez, B. Wild, N. Garcia-Quintans, S. Cabezudo, S. Lamas and M. Monsalve (2013). "SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1alpha complex." Antioxid Redox Signal **19**(13): 1507-1521.

Ong, S. B. and D. J. Hausenloy (2010). "Mitochondrial morphology and cardiovascular disease." Cardiovasc Res **88**(1): 16-29.

Osorio, J. C., W. C. Stanley, A. Linke, M. Castellari, Q. N. Diep, A. R. Panchal, T. H. Hintze, G. D. Lopaschuk and F. A. Recchia (2002). "Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure." Circulation **106**(5): 606-612.

Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.

Palade, G. E. (1955). "Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ." J Biophys Biochem Cytol **1**(6): 567-582.

Palade, G. E. and K. R. Porter (1954). "Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ." J Exp Med **100**(6): 641-656.

Pan, Y. X., L. Lin, A. J. Ren, X. J. Pan, H. Chen, C. S. Tang and W. J. Yuan (2004). "HSP70 and GRP78 induced by endothelin-1 pretreatment enhance tolerance to hypoxia in cultured neonatal rat cardiomyocytes." J Cardiovasc Pharmacol **44 Suppl 1**: S117-120.

Paredes, S., L. Villanova and K. F. Chua (2014). "Molecular pathways: emerging roles of mammalian Sirtuin SIRT7 in cancer." Clin Cancer Res **20**(7): 1741-1746.

Park, C. S., H. Cha, E. J. Kwon, P. K. Sreenivasaiah and H. Kim do (2012). "The chemical chaperone 4-phenylbutyric acid attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy by alleviating endoplasmic reticulum stress." Biochem Biophys Res Commun **421**(3): 578-584.

Park, J. W., K. J. Woo, J. T. Lee, J. H. Lim, T. J. Lee, S. H. Kim, Y. H. Choi and T. K. Kwon (2007). "Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells." Oncol Rep **18**(5): 1269-1273.

Passariello, C. L., M. Zini, P. A. Nassi, C. Pignatti and C. Stefanelli (2011). "Upregulation of SIRT1 deacetylase in phenylephrine-treated cardiomyoblasts." Biochem Biophys Res Commun **407**(3): 512-516.

Patterson, J. H., K. F. Adams, Jr., M. M. Applefeld, C. N. Corder and B. R. Masse (1994). "Oral torsemide in patients with chronic congestive heart failure: effects on body weight, edema, and electrolyte excretion. Torsemide Investigators Group." Pharmacotherapy **14**(5): 514-521.

Patterson, S. D., C. S. Spahr, E. Daugas, S. A. Susin, T. Irinopoulou, C. Koehler and G. Kroemer (2000). "Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition." Cell Death Differ **7**(2): 137-144.

Pazienza, V., M. Borghesan, T. Mazza, F. Sheedfar, C. Panebianco, R. Williams, G. Mazzocchi, A. Andriulli, T. Nakanishi and M. Vinciguerra (2014). "SIRT1-metabolite binding histone macroH2A1.1 protects hepatocytes against lipid accumulation." Aging (Albany NY) **6**(1): 35-47.

Peck, B., C. Y. Chen, K. K. Ho, P. Di Fruscia, S. S. Myatt, R. C. Coombes, M. J. Fuchter, C. D. Hsiao and E. W. Lam (2010). "SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2." Mol Cancer Ther **9**(4): 844-855.

Philchenkov, A. (2004). "Caspases: potential targets for regulating cell death." J Cell Mol Med **8**(4): 432-444.

Pillai, J. B., A. Isbatan, S. Imai and M. P. Gupta (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD<sup>+</sup> depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity." J Biol Chem **280**(52): 43121-43130.

Piquereau, J., F. Caffin, M. Novotova, A. Prola, A. Garnier, P. Mateo, D. Fortin, H. Huynh le, V. Nicolas, M. V. Alavi, C. Brenner, R. Ventura-Clapier, V. Veksler and F. Joubert (2012). "Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload." Cardiovasc Res **94**(3): 408-417.

Porter, K. R. and G. E. Palade (1957). "Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells." J Biophys Biochem Cytol **3**(2): 269-300.

Prozorovski, T., U. Schulze-Topphoff, R. Glumm, J. Baumgart, F. Schroter, O. Ninnemann, E. Siegert, I. Bendix, O. Brustle, R. Nitsch, F. Zipp and O. Aktas (2008). "Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors." Nat Cell Biol **10**(4): 385-394.

Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.

Radak, Z., Z. Zhao, E. Koltai, H. Ohno and M. Atalay (2013). "Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling." Antioxid Redox Signal **18**(10): 1208-1246.

Rane, S., M. He, D. Sayed, H. Vashistha, A. Malhotra, J. Sadoshima, D. E. Vatner, S. F. Vatner and M. Abdellatif (2009). "Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes." Circ Res **104**(7): 879-886.

Rao, R. V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen and H. M. Ellerby (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway." J Biol Chem **277**(24): 21836-21842.

Rato, L., A. I. Duarte, G. D. Tomas, M. S. Santos, P. I. Moreira, S. Socorro, J. E. Cavaco, M. G. Alves and P. F. Oliveira (2014). "Pre-diabetes alters testicular PGC1-alpha/SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress." Biochim Biophys Acta **1837**(3): 335-344.

Rauch, U., K. Schulze, B. Witzendichler and H. P. Schultheiss (1994). "Alteration of the cytosolic-mitochondrial distribution of high-energy phosphates during global myocardial ischemia may contribute to early contractile failure." Circ Res **75**(4): 760-769.

Raven, J. F. and A. E. Koromilas (2008). "PERK and PKR: old kinases learn new tricks." Cell Cycle **7**(9): 1146-1150.

Raynes, R., K. M. Pombier, K. Nguyen, J. Brunquell, J. E. Mendez and S. D. Westerheide (2013). "The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response." PLoS One **8**(1): e54364.

Rimbaud, S., M. Ruiz, J. Piquereau, P. Mateo, D. Fortin, V. Veksler, A. Garnier and R. Ventura-Clapier (2011). "Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure." PLoS One **6**(10): e26391.

Rine, J. and I. Herskowitz (1987). "Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **116**(1): 9-22.

Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft and T. Pozzan (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses." Science **280**(5370): 1763-1766.

Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman and P. Puigserver (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.

Rogina, B. and S. L. Helfand (2004). "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(45): 15998-16003.

Ron, D. and H. P. Harding (2012). "Protein-folding homeostasis in the endoplasmic reticulum and nutritional regulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).

Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.

Rossi, D., V. Barone, E. Giacomello, V. Cusimano and V. Sorrentino (2008). "The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains." Traffic **9**(7): 1044-1049.

Russo, G. L., M. Russo and P. Ungaro (2013). "AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer." Biochem Pharmacol **86**(3): 339-350.

Rutkowski, D. T., S. W. Kang, A. G. Goodman, J. L. Garrison, J. Taunton, M. G. Katze, R. J. Kaufman and R. S. Hegde (2007). "The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **18**(9): 3681-3691.

Rutkowski, D. T., J. Wu, S. H. Back, M. U. Callaghan, S. P. Ferris, J. Iqbal, R. Clark, H. Miao, J. R. Hassler, J. Fornek, M. G. Katze, M. M. Hussain, B. Song, J. Swathirajan, J. Wang, G. D. Yau and R. J. Kaufman (2008). "UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators." Dev Cell **15**(6): 829-840.

Saks, V. A., Z. A. Khuchua, E. V. Vasilyeva, O. Belikova and A. V. Kuznetsov (1994). "Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis." Mol Cell Biochem **133-134**: 155-192.

Saks, V. A., R. Ventura-Clapier and M. K. Aliev (1996). "Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells." Biochim Biophys Acta **1274**(3): 81-88.



Salas-Marco, J. and D. M. Bedwell (2004). "GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination." Mol Cell Biol **24**(17): 7769-7778.

Samant, S. A., H. J. Zhang, Z. Hong, V. B. Pillai, N. R. Sundaresan, D. Wolfgeher, S. L. Archer, D. C. Chan and M. P. Gupta (2014). "SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress." Mol Cell Biol **34**(5): 807-819.

Sano, R. and J. C. Reed (2013). "ER stress-induced cell death mechanisms." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3460-3470.

Saraste, A., K. Pulkki, M. Kallajoki, P. Heikkila, P. Laine, S. Mattila, M. S. Nieminen, M. Parvinen and L. M. Voipio-Pulkki (1999). "Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation." Eur J Clin Invest **29**(5): 380-386.

Sasaki, T., B. Maier, K. D. Koclega, M. Chruszcz, W. Gluba, P. T. Stukenberg, W. Minor and H. Scrable (2008). "Phosphorylation regulates SIRT1 function." PLoS One **3**(12): e4020.

Sauer-Eriksson, A. E. and T. Hainzl (2003). "S-domain assembly of the signal recognition particle." Curr Opin Struct Biol **13**(1): 64-70.

Savabi, F. and A. Kirsch (1991). "Alteration of the phosphocreatine energy shuttle components in diabetic rat heart." J Mol Cell Cardiol **23**(11): 1323-1333.

Schaper, J., E. Meiser and G. Stammeler (1985). "Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts." Circ Res **56**(3): 377-391.

Schmeisser, K., J. Mansfeld, D. Kuhlow, S. Weimer, S. Priebe, I. Heiland, M. Birringer, M. Groth, A. Segref, Y. Kanfi, N. L. Price, S. Schmeisser, S. Schuster, A. F. Pfeiffer, R. Guthke, M. Platzer, T. Hoppe, H. Y. Cohen, K. Zarse, D. A. Sinclair and M. Ristow (2013). "Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide." Nat Chem Biol **9**(11): 693-700.

Schwartz, L. M. (1992). "Insect muscle as a model for programmed cell death." J Neurobiol **23**(9): 1312-1326.

Senyo, S. E., M. L. Steinhauser, C. L. Pizzimenti, V. K. Yang, L. Cai, M. Wang, T. D. Wu, J. L. Guerquin-Kern, C. P. Lechene and R. T. Lee (2013). "Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes." Nature **493**(7432): 433-436.

Sequeira, J., G. Boily, S. Bazinet, S. Saliba, X. He, K. Jardine, C. Kennedy, W. Staines, C. Rousseaux, R. Mueller and M. W. McBurney (2008). "sirt1-null mice develop an autoimmune-like condition." Exp Cell Res **314**(16): 3069-3074.

Severino, A., M. Campioni, S. Straino, F. N. Salloum, N. Schmidt, U. Herbrand, S. Frede, G. Toietta, G. Di Rocco, R. Bussani, F. Silvestri, M. Piro, G. Liuzzo, L. M. Biasucci, P. Mellone, F. Feroce, M. Capogrossi, F. Baldi, J. Fandrey, M. Ehrmann, F. Crea, A. Abbate and A. Baldi (2007). "Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **50**(11): 1029-1037.



Shah, A. M. and D. L. Mann (2011). "In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science." Lancet **378**(9792): 704-712.

Sharaf El Dein, O., C. Gallerne, A. Deniaud, C. Brenner and C. Lemaire (2009). "Role of the permeability transition pore complex in lethal inter-organelle crosstalk." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 3465-3482.

Shen, M., L. Wang, G. Yang, L. Gao, B. Wang, X. Guo, C. Zeng, Y. Xu, L. Shen, K. Cheng, Y. Xia, X. Li, H. Wang, L. Fan and X. Wang (2014). "Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase." PLoS One **9**(2): e88389.

Sheridan, C., P. Delivani, S. P. Cullen and S. J. Martin (2008). "Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release." Mol Cell **31**(4): 570-585.

Shi, F. H., Y. S. Cheng, D. Z. Dai, H. J. Peng, X. D. Cong and Y. Dai (2013). "Depressed calcium-handling proteins due to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the diabetic heart are attenuated by argirein." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **386**(6): 521-531.

Shintani-Ishida, K., M. Nakajima, K. Uemura and K. Yoshida (2006). "Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1600-1605.

Sipido, K. R. and E. Marban (1991). "L-type calcium channels, potassium channels, and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle." Circ Res **69**(6): 1487-1499.

Skulachev, V. P. (2001). "Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables." Trends Biochem Sci **26**(1): 23-29.

Small, E. M., R. J. Frost and E. N. Olson (2010). "MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease." Circulation **121**(8): 1022-1032.

Smith, B. C., W. C. Hallows and J. M. Denu (2009). "A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes." Anal Biochem **394**(1): 101-109.

Smith, R. B. (1970). "The innervation of the human foetal parietal pericardium." J Anat **106**(Pt 1): 181.

Song, S., P. Gao, H. Xiao, Y. Xu and L. Y. Si (2013). "Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress." PLoS One **8**(12): e82968.

Song, X. J., C. Y. Yang, B. Liu, Q. Wei, M. T. Korkor, J. Y. Liu and P. Yang (2011). "Atorvastatin inhibits myocardial cell apoptosis in a rat model with post-myocardial infarction heart failure by downregulating ER stress response." Int J Med Sci **8**(7): 564-572.

Soubannier, V. and H. M. McBride (2009). "Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 154-170.

Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia and A. J. Parodi (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry **31**(1): 97-105.

Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1999). "Catalytic properties of the caspases." Cell Death Differ **6**(11): 1054-1059.

Strasser, A., S. Cory and J. M. Adams (2011). "Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases." EMBO J **30**(18): 3667-3683.

Su, S. F., Y. W. Chang, C. Andreu-Vieyra, J. Y. Fang, Z. Yang, B. Han, A. S. Lee and G. Liang (2013). "miR-30d, miR-181a and miR-199a-5p cooperatively suppress the endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator GRP78 in cancer." Oncogene **32**(39): 4694-4701.

Sundaresan, N. R., V. B. Pillai and M. P. Gupta (2011). "Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **51**(4): 614-618.

Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger and G. Kroemer (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-446.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-621.

Swindell, W. R. (2012). "Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan." Ageing Res Rev **11**(2): 254-270.

Szegezdi, E., A. Duffy, M. E. O'Mahoney, S. E. Logue, L. A. Mylotte, T. O'Brien and A. Samali (2006). "ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **349**(4): 1406-1411.

Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman and A. Samali (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-885.

Sztark, F., J. F. Payen, V. Piriou, M. Rigoulet, R. Ventura-Clapier, J. P. Mazat, X. Leverve and G. Janvier (1999). "[Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects]." Ann Fr Anesth Reanim **18**(2): 261-269.

Taegtmeyer, H., L. Golfman, S. Sharma, P. Razeghi and M. van Arsdall (2004). "Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart." Ann N Y Acad Sci **1015**: 202-213.

Takada, A., T. Miki, A. Kuno, H. Kouzu, D. Sunaga, T. Itoh, M. Tanno, T. Yano, T. Sato, S. Ishikawa and T. Miura (2012). "Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes." PLoS One **7**(6): e39893.

- Tanno, M., A. Kuno, T. Yano, T. Miura, S. Hisahara, S. Ishikawa, K. Shimamoto and Y. Horio (2010). "Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure." J Biol Chem **285**(11): 8375-8382.
- Taylor, S. C., A. D. Ferguson, J. J. Bergeron and D. Y. Thomas (2004). "The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation." Nat Struct Mol Biol **11**(2): 128-134.
- Teyssier, C., H. Ma, R. Emter, A. Kralli and M. R. Stallcup (2005). "Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 $\alpha$  by arginine methylation." Genes Dev **19**(12): 1466-1473.
- Thompson, J. W., K. R. Dave, I. Saul, S. V. Narayanan and M. A. Perez-Pinzon (2013). "Epsilon PKC increases brain mitochondrial SIRT1 protein levels via heat shock protein 90 following ischemic preconditioning in rats." PLoS One **8**(9): e75753.
- Thuerauf, D. J., M. Marcinko, N. Gude, M. Rubio, M. A. Sussman and C. C. Glembotski (2006). "Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes." Circ Res **99**(3): 275-282.
- Tong, C., A. Morrison, S. Mattison, S. Qian, M. Bryniarski, B. Rankin, J. Wang, D. P. Thomas and J. Li (2013). "Impaired SIRT1 nucleocytoplasmic shuttling in the senescent heart during ischemic stress." FASEB J **27**(11): 4332-4342.
- Tsai, Y. C. and A. M. Weissman (2010). "The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer." Genes Cancer **1**(7): 764-778.
- Turdi, S., N. Hu and J. Ren (2013). "Tauroursodeoxycholic acid mitigates high fat diet-induced cardiomyocyte contractile and intracellular Ca<sup>2+</sup> anomalies." PLoS One **8**(5): e63615.
- Twig, G., A. Elorza, A. J. Molina, H. Mohamed, J. D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S. E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B. F. Py, J. Yuan, J. T. Deeney, B. E. Corkey and O. S. Shirihai (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." EMBO J **27**(2): 433-446.
- Upton, J. P., L. Wang, D. Han, E. S. Wang, N. E. Huskey, L. Lim, M. Truitt, M. T. McManus, D. Ruggero, A. Goga, F. R. Papa and S. A. Oakes (2012). "IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2." Science **338**(6108): 818-822.
- Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**(5453): 664-666.
- Vaquero, A., M. Scher, D. Lee, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. Reinberg (2004). "Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin." Mol Cell **16**(1): 93-105.

Vaux, D. L., G. Haecker and A. Strasser (1994). "An evolutionary perspective on apoptosis." Cell **76**(5): 777-779.

Vayssiere, J. L., P. X. Petit, Y. Risler and B. Mignotte (1994). "Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11752-11756.

Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente and R. A. Weinberg (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-159.

Vega, R. B., J. M. Huss and D. P. Kelly (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." Mol Cell Biol **20**(5): 1868-1876.

Vekich, J. A., P. J. Belmont, D. J. Thuerlauf and C. C. Glembotski (2012). "Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death." J Mol Cell Cardiol **53**(2): 259-267.

Veksler, V. I., A. V. Kuznetsov, K. Anflous, P. Mateo, J. van Deursen, B. Wieringa and R. Ventura-Clapier (1995). "Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function." J Biol Chem **270**(34): 19921-19929.

Veksler, V. I., A. V. Kuznetsov, V. G. Sharov, V. I. Kapelko and V. A. Saks (1987). "Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers." Biochim Biophys Acta **892**(2): 191-196.

Venkatasubramanian, S., R. M. Noh, S. Daga, J. P. Langrish, N. V. Joshi, N. L. Mills, E. Hoffmann, E. W. Jacobson, G. P. Vlasuk, B. R. Waterhouse, N. N. Lang and D. E. Newby (2013). "Cardiovascular effects of a novel SIRT1 activator, SRT2104, in otherwise healthy cigarette smokers." J Am Heart Assoc **2**(3): e000042.

Ventura-Clapier, R., A. Garnier and V. Veksler (2008). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha." Cardiovasc Res **79**(2): 208-217.

Ventura-Clapier, R., A. Garnier, V. Veksler and F. Joubert (2011). "Bioenergetics of the failing heart." Biochim Biophys Acta **1813**(7): 1360-1372.

Ventura-Clapier, R., A. V. Kuznetsov, A. d'Albis, J. van Deursen, B. Wieringa and V. I. Veksler (1995). "Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function." J Biol Chem **270**(34): 19914-19920.

Ventura-Clapier, R., V. Veksler and J. A. Hoerter (1994). "Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction." Mol Cell Biochem **133-134**: 125-144.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.

Vertel, B. M., L. M. Walters and D. Mills (1992). "Subcompartments of the endoplasmic reticulum." Semin Cell Biol **3**(5): 325-341.

Vinciguerra, M., M. P. Santini, C. Martinez, V. Paziienza, W. C. Claycomb, A. Giuliani and N. Rosenthal (2012). "mIGF-1/JNK1/SirT1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart." Aging Cell **11**(1): 139-149.

Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1309-1313.

Volpe, P., A. Villa, P. Podini, A. Martini, A. Nori, M. C. Panzeri and J. Meldolesi (1992). "The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6142-6146.

Voos, W., H. Martin, T. Krimmer and N. Pfanner (1999). "Mechanisms of protein translocation into mitochondria." Biochim Biophys Acta **1422**(3): 235-254.

Wallimann, T., M. Dolder, U. Schlattner, M. Eder, T. Hornemann, E. O'Gorman, A. Ruck and D. Brdiczka (1998). "Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology." Biofactors **8**(3-4): 229-234.

Wang, B., M. K. Hasan, E. Alvarado, H. Yuan, H. Wu and W. Y. Chen (2011). "NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response." Oncogene **30**(8): 907-921.

Wang, C., L. Chen, X. Hou, Z. Li, N. Kabra, Y. Ma, S. Nemoto, T. Finkel, W. Gu, W. D. Cress and J. Chen (2006). "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage." Nat Cell Biol **8**(9): 1025-1031.

Wang, J. and S. Dore (2007). "Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage." Brain **130**(Pt 6): 1643-1652.

Wang, J., Y. Wang, S. Shan, T. Hu, H. Chen, J. Tian, A. Ren, X. Zhou, W. Yuan and L. Lin (2012). "Salusins protect myocardium against ischemic injury by alleviating endoplasmic reticulum stress." Sci China Life Sci **55**(4): 358-366.

Wang, S., P. Song and M. H. Zou (2012). "Inhibition of AMP-activated protein kinase alpha (AMPKalpha) by doxorubicin accentuates genotoxic stress and cell death in mouse embryonic fibroblasts and cardiomyocytes: role of p53 and SIRT1." J Biol Chem **287**(11): 8001-8012.

Wang, X., L. Ni, L. Yang, Q. Duan, C. Chen, M. L. Edin, D. C. Zeldin and D. W. Wang (2014). "CYP2J2-derived epoxyeicosatrienoic acids suppress endoplasmic reticulum stress in heart failure." Mol Pharmacol **85**(1): 105-115.

Wang, X. Y., C. T. Yang, D. D. Zheng, L. Q. Mo, A. P. Lan, Z. L. Yang, F. Hu, P. X. Chen, X. X. Liao and J. Q. Feng (2012). "Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of endoplasmic reticulum stress." Mol Cell Biochem **363**(1-2): 419-426.

Wang, Y., W. J. Pang, N. Wei, Y. Xiong, W. J. Wu, C. Z. Zhao, Q. W. Shen and G. S. Yang (2014). "Identification, stability and expression of Sirt1 antisense long non-coding RNA." Gene **539**(1): 117-124.

Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**(6367): 314-317.

Wei, H., R. Zhang, H. Jin, D. Liu, X. Tang, C. Tang and J. Du (2010). "Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats." Antioxid Redox Signal **12**(9): 1079-1091.

Wen, L., Z. Chen, F. Zhang, X. Cui, W. Sun, G. G. Geary, Y. Wang, D. A. Johnson, Y. Zhu, S. Chien and J. Y. Shyy (2013). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta phosphorylation of Sirtuin 1 in endothelium is atheroprotective." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(26): E2420-2427.

Wencker, D., M. Chandra, K. Nguyen, W. Miao, S. Garantziotis, S. M. Factor, J. Shirani, R. C. Armstrong and R. N. Kitsis (2003). "A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure." J Clin Invest **111**(10): 1497-1504.

Westerheide, S. D., J. Ankar, S. M. Stevens, Jr., L. Sistonen and R. I. Morimoto (2009). "Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1." Science **323**(5917): 1063-1066.

Wey, S., B. Luo and A. S. Lee (2012). "Acute inducible ablation of GRP78 reveals its role in hematopoietic stem cell survival, lymphogenesis and regulation of stress signaling." PLoS One **7**(6): e39047.

Wilding, J. R., F. Joubert, C. de Araujo, D. Fortin, M. Novotova, V. Veksler and R. Ventura-Clapier (2006). "Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts." J Physiol **575**(Pt 1): 191-200.

Williams, D. B. (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **119**(Pt 4): 615-623.

Williams, G. T. (1991). "Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis." Cell **65**(7): 1097-1098.

Woehlbier, U. and C. Hetz (2011). "Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death." Trends Biochem Sci **36**(6): 329-337.

Wormald, M. R. and R. A. Dwek (1999). "Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability." Structure **7**(7): R155-160.



Wu, G., C. Song, H. Lu, L. Jia, G. Yang, X. Shi and S. Sun (2014). "Sirt2 induces C2C12 myoblasts proliferation by activation of the ERK1/2 pathway." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **46**(4): 342-345.

Wu, T., Z. Dong, J. Geng, Y. Sun, G. Liu, W. Kang, Y. Zhang and Z. Ge (2011). "Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats." Eur J Pharm Sci **42**(5): 496-502.

Xie, J., X. Zhang and L. Zhang (2013). "Negative regulation of inflammation by SIRT1." Pharmacol Res **67**(1): 60-67.

Xin, W., X. Li, X. Lu, K. Niu and J. Cai (2011). "Involvement of endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in a heart failure model induced by chronic myocardial ischemia." Int J Mol Med **27**(4): 503-509.

Xu, F. F., X. H. Liu, Z. Y. Zhang and L. R. Cai (2009). "[Cardioprotective mechanism of calreticulin up-regulation induced by hypoxic postconditioning.]" Sheng Li Xue Bao **61**(1): 35-42.

Xu, J. Q., P. Liu, M. J. Si and X. Y. Ding (2013). "MicroRNA-126 inhibits osteosarcoma cells proliferation by targeting Sirt1." Tumour Biol **34**(6): 3871-3877.

Xue, M., M. Liu, X. Zhu, L. Yang, Y. Miao, D. Shi and H. Yin (2013). "Effective Components of Panax quinquefolius and Corydalis tuber Protect Myocardium through Attenuating Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 482318.

Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **279**(44): 45495-45502.

Yamakuchi, M., M. Ferlito and C. J. Lowenstein (2008). "miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13421-13426.

Yamamoto, K., K. Takahara, S. Oyadomari, T. Okada, T. Sato, A. Harada and K. Mori (2010). "Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **21**(17): 2975-2986.

Yan, W., C. L. Frank, M. J. Korth, B. L. Sopher, I. Novoa, D. Ron and M. G. Katze (2002). "Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15920-15925.

Yang, H., W. Zhang, H. Pan, H. G. Feldser, E. Lainez, C. Miller, S. Leung, Z. Zhong, H. Zhao, S. Sweitzer, T. Considine, T. Riera, V. Suri, B. White, J. L. Ellis, G. P. Vlasuk and C. Loh (2012). "SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-kappaB activity." PLoS One **7**(9): e46364.

Yang, X. J. and E. Seto (2008). "Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications." Mol Cell **31**(4): 449-461.



- Yang, Y., W. Fu, J. Chen, N. Olashaw, X. Zhang, S. V. Nicosia, K. Bhalla and W. Bai (2007). "SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress." Nat Cell Biol **9**(11): 1253-1262.
- Yang, Y., C. Li, X. Xiang, Z. Dai, J. Chang, M. Zhang, H. Cai, H. Zhang, M. Zhang, Y. Guo and Z. Wu (2014). "Ursolic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by heat stress in mouse cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **67**: 103-111.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama and M. Tohyama (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." J Biol Chem **276**(17): 13935-13940.
- Yoon, D. H., O. Y. Kwon, J. Y. Mang, M. J. Jung, Y. Kim do, Y. K. Park, T. H. Heo and S. J. Kim (2011). "Protective potential of resveratrol against oxidative stress and apoptosis in Batten disease lymphoblast cells." Biochem Biophys Res Commun **414**(1): 49-52.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-891.
- Younce, C. W., M. A. Burmeister and J. E. Ayala (2013). "Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a." Am J Physiol Cell Physiol **304**(6): C508-518.
- Yuan, J., K. Minter-Dykhouse and Z. Lou (2009). "A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation." J Cell Biol **185**(2): 203-211.
- Yuan, Z. and E. Seto (2007). "A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response." Cell Cycle **6**(23): 2869-2871.
- Yueh, M. F. and R. H. Tukey (2007). "Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice." J Biol Chem **282**(12): 8749-8758.
- Zhang, L., X. Wang and P. Chen (2013). "MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells." BMC Cancer **13**: 290.
- Zhang, P. L., M. Lun, J. Teng, J. Huang, T. M. Blasick, L. Yin, G. A. Herrera and J. Y. Cheung (2004). "Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury." Ann Clin Lab Sci **34**(4): 449-457.
- Zhang, Q., H. Li, S. Wang, M. Liu, Y. Feng and X. Wang (2013). "Icariin protects rat cardiac H9c2 cells from apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress." Int J Mol Sci **14**(9): 17845-17860.
- Zhang, Q., S. Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J. V. Rocheleau, D. W. Piston and R. H. Goodman (2007). "Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 829-833.

- Zhang, R., H. Z. Chen, J. J. Liu, Y. Y. Jia, Z. Q. Zhang, R. F. Yang, Y. Zhang, J. Xu, Y. S. Wei, D. P. Liu and C. C. Liang (2010). "SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages." J Biol Chem **285**(10): 7097-7110.
- Zhang, S., L. Liu, R. Wang, H. Tuo, Y. Guo, L. Yi, D. Wang and J. Wang (2013). "MicroRNA-217 promotes angiogenesis of human cytomegalovirus-infected endothelial cells through downregulation of SIRT1 and FOXO3A." PLoS One **8**(12): e83620.
- Zhao, H., Y. Liao, T. Minamino, Y. Asano, M. Asakura, J. Kim, H. Asanuma, S. Takashima, M. Hori and M. Kitakaze (2008). "Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress." Hypertens Res **31**(10): 1977-1987.
- Zhao, W., J. P. Kruse, Y. Tang, S. Y. Jung, J. Qin and W. Gu (2008). "Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1." Nature **451**(7178): 587-590.
- Zhao, W., J. Zhao, M. Hou, Y. Wang, Y. Zhang, X. Zhao, C. Zhang and D. Guo (2014). "HuR and TIA1/TIAL1 are involved in regulation of alternative splicing of SIRT1 pre-mRNA." Int J Mol Sci **15**(2): 2946-2958.
- Zhao, X., D. Allison, B. Condon, F. Zhang, T. Gheyi, A. Zhang, S. Ashok, M. Russell, I. MacEwan, Y. Qian, J. A. Jamison and J. G. Luz (2013). "The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) and an indole (EX527 analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition." J Med Chem **56**(3): 963-969.
- Zheng, W., Y. B. Lu, S. T. Liang, Q. J. Zhang, J. Xu, Z. G. She, Z. Q. Zhang, R. F. Yang, B. B. Mao, Z. Xu, L. Li, D. L. Hao, J. Lu, Y. S. Wei, H. Z. Chen and D. P. Liu (2013). "SIRT1 mediates the protective function of Nkx2.5 during stress in cardiomyocytes." Basic Res Cardiol **108**(4): 364.
- Zhou, B., Y. Zhang, F. Zhang, Y. Xia, J. Liu, R. Huang, Y. Wang, Y. Hu, J. Wu, C. Dai, H. Wang, Y. Tu, X. Peng, Y. Wang and Q. Zhai (2014). "CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1." Hepatology.
- Zhu, G. Y., B. Z. Shi and Y. Li (2014). "FoxM1 regulates Sirt1 expression in glioma cells." Eur Rev Med Pharmacol Sci **18**(2): 205-211.
- Zhu, H., L. Xia, Y. Zhang, H. Wang, W. Xu, H. Hu, J. Wang, J. Xin, Y. Gang, S. Sha, B. Xu, D. Fan, Y. Nie and K. Wu (2012). "Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression." PLoS One **7**(2): e31431.
- Zhu, H., Y. Yang, Y. Wang, J. Li, P. W. Schiller and T. Peng (2011). "MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1." Cardiovasc Res **92**(1): 75-84.
- Zhu, X. M., X. H. Liu, L. R. Cai and F. F. Xu (2006). "[Hypoxic preconditioning induces endoplasmic reticulum stress-related cardioprotection mediated by p38 mitogen-activated protein kinase]." Sheng Li Xue Bao **58**(5): 463-470.

Zhuo, X. Z., Y. Wu, Y. J. Ni, J. H. Liu, M. Gong, X. H. Wang, F. Wei, T. Z. Wang, Z. Yuan, A. Q. Ma and P. Song (2013). "Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress." Apoptosis **18**(7): 800-810.

Zoll, J., L. Monassier, A. Garnier, B. N'Guessan, B. Mettauer, V. Veksler, F. Piquard, R. Ventura-Clapier and B. Geny (2006). "ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction." J Appl Physiol (1985) **101**(2): 385-391.

Zoratti, M. and I. Szabo (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1241**(2): 139-176.

***Introduction***

***Matériel et Méthodes***

***Résultats***

***Discussion***

***Bibliographie***

***Annexes***



## **Article 1**

**Prola A**, Guilbert A, Pires Da Silva J, Lecru L, Piquereau J, Mateo P, Lefebvre F, Fortin D, Gressette M, Boursier C, Gallerne C, François H, Garnier A, Eid P, Ventura-Clapier R and Lemaire C

*SIRT1 regulates endoplasmic reticulum stress through deacetylation of eIF2 $\alpha$*

En préparation





## **Article 2**

Gallerne C, **Prola A**, Lemaire C.

*Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2.*

Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res (2013) 1833(6):1356-66.



### **Article 3**

Caffin F, **Prola A**, Piquereau J, Novotova M, David DJ, Garnier A, Fortin D, Alavi M, Veksler V, Ventura-Clapier R, Joubert F.

*Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice.*

J Physiol. (2013) 1;591(Pt 23):6017-37



## **Article 4**

Piquereau J, Caffin F, Novotova M, **Prola A**, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh le H, Nicolas V, Alavi MV, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F.

*Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload.*

Cardiovasc Res. (2012) 94(3):408-17.



## **Article 5**

Diguet N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, **Prola A**, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M

*Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy*

J Biol Chem. (2011) 286(40):35007-19.





## **Article 6**

Joly-Amado A, Denis RG, Castel J, Lacombe A, Cansell C, Rouch C, Kassis N, Dairou J, Cani PD, Ventura-Clapier R, **Prola A**, Flamment M, Fougelle F, Magnan C, Luquet S.

*Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning.*

EMBO J. (2012) 31(22):4276-88

